

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE MADRID

Facultad de Medicina

Departamento de Cirugía

TESIS DOCTORAL

MODELO EXPERIMENTAL DE ANASTOMOSIS ILEO-CÓLICA DE ALTO  
RIESGO EN CERDOS. ESTUDIO ALEATORIZADO SOBRE EL EFECTO DEL  
REFUERZO DE LA ANASTOMOSIS CON UN PARCHE DE FIBRINA EN  
CICATRIZACIÓN Y PREVENCIÓN DE DEHISCENCIA.

Doctorando: Carlos García Vásquez

Madrid, noviembre 2018

# **RESUMEN**

## **Introducción y justificación**

Desde el punto de vista más amplio, en las ciencias biológicas, se define el termino “anastomosis” como la unión de unos elementos anatómicos con otros en la misma planta o del mismo animal. La unión de segmentos del tubo digestivo, con el objetivo de restituir o derivar el tránsito intestinal, constituye un elemento esencial e imprescindible en la cirugía digestiva. Dicha unión debe permanecer estanca y permeable con buen paso a su través de forma estable en el tiempo, ya que de no ser así se presentan complicaciones como la dehiscencia anastomótica con vertido de contenido intestinal a la cavidad abdominal o la obstrucción del tránsito intestinal por estenosis de la anastomosis.

En nuestro medio la dehiscencia de sutura en cirugía colorrectal está próxima al 8-10%. Este porcentaje se incrementa exponencialmente en los casos de anastomosis rectales bajas, anastomosis en condiciones críticas o realizadas en cirugías urgentes. La dehiscencia de sutura es por tanto, una fuente de problemas, condicionando un aumento de la morbimortalidad postquirúrgica y afectando de manera negativa a la supervivencia global.

Los estudios publicados muestran resultados contradictorios en cuanto a el papel protector de los parche de fibrina en la dehiscencia y están realizados en modelos experimentales no equiparable al intestino humano.

Es por esto por lo que se diseña el presente proyecto de investigación para desarrollar un modelo y evaluar el papel de la colocación del parche de fibrina en la dehiscencia de anastomosis.

## **Materiales y Métodos:**

La primera fase consiste en diseñar un modelo de dehiscencia de anastomosis mediante la confección de una sutura íleo-cólica en condiciones de hipovascularización-isquemia. Para este modelo se elige el cerdo por su similitud anatómica y fisiológica con el intestino humano y la posibilidad de realizar una isquemia selectiva de la arteria marginal del intestino antes de confeccionar la anastomosis. La segunda parte del proyecto consiste en evaluar el papel de la colocación del parche de fibrina a modo de refuerzo sobre la anastomosis



potencialmente dehiscente desde un punto de vista clínico, macroscópico y microscópico para posteriormente ampliar el estudio de la muestra mediante la valoración de expresión inmunohistoquímica de los factores kB-p65 y HIF-1 $\alpha$ .

### **Resultados:**

En la primera fase se observó un 30% de dehiscencia macroscópica en el modelo diseñado. En la segunda fase del proyecto encontramos una reducción significativa del porcentaje de dehiscencia de anastomosis en el grupo casos frente al grupo control (13,3% vs. 57,1%;  $p=0,013$ ). En la tercera fase, en el grupo casos, observamos que la expresión del HIF-1 $\alpha$  se torna mayoritariamente citoplasmática, reduciendo de forma relativa y estadísticamente significativa la expresión nuclear encontrada en el grupo control. Respecto a la expresión IHQ de NF-kB-p65 se encontró una mayor expresión a nivel del endotelio del lecho quirúrgico (72,7% vs 33%;  $p<0,05$ ). En referencia al resto del patrón de expresión de NF-kB-p65 en relación con la presencia del parche no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

### **Discusión:**

Hemos observado que la presencia del parche está asociada a una reacción inflamatoria más localizada o limitada a la zona de anastomosis, lo cual retrasa o al menos altera la respuesta del tejido a la hipoxia, como lo demuestra la falta de translocación de HIF-1 $\alpha$  en los núcleos celulares en la base de las criptas, pero por otro lado, el parche mejora la neovascularización mediada por NF-kB-p65 en lo que parece un intento de favorecer la cicatrización del tejido después de una reacción inflamatoria. A pesar de que inicialmente lo puede parecer, estos hallazgos moleculares no se presentan como incompatibles con un efecto clínico beneficioso, expresado en una reducción significativa de la fuga anastomótica.

**MODELO EXPERIMENTAL DE ANASTOMOSIS ILEO-  
CÓLICA DE ALTO RIESGO EN CERDOS. ESTUDIO  
ALEATORIZADO SOBRE EL EFECTO DEL REFUERZO  
DE LA ANASTOMOSIS CON UN PARCHE DE FIBRINA  
EN CICATRIZACIÓN Y PREVENCIÓN DE DEHISCENCIA.**

Trabajo presentado por

CARLOS ERNESTO GARCIA VASQUEZ

Para optar al título de Doctor en Medicina en el Departamento de Cirugía  
de la Universidad Autónoma de Madrid

Dirigido por el Profesor Doctor

Dr. CARLOS PASTOR IDOATE

Y por la Profesora Doctora

Dra. MARÍA JESÚS FERNÁNDEZ ACEÑERO

Departamento de Cirugía

Universidad Autónoma de Madrid

Noviembre 2018

A mi familia por su apoyo,  
a Martina por iluminarme la vida.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero dar mi más profundo agradecimiento a todas las personas que han participado en este trabajo, por el apoyo y la confianza que me han prestado de forma desinteresada. De forma muy especial quiero reconocer al Dr. Carlos Pastor, por su confianza, apoyo y consejo durante la dirección de esta tesis. Su orientación y ayuda han hecho posible la existencia y finalización de este trabajo. De igual manera he de agradecer a la Dra. María Jesús Fernández Aceñero, con su incansable guía, energía y consejo en la realización de esta tesis, así como su disposición para hacer asimilable el gran trabajo realizado debajo del microscopio.

A la Dra. María Soledad García Gómez de las Heras, ofreciendo su apoyo de forma inmediata y generosa, sin cuya ayuda este trabajo estaría incompleto.

Al Profesor Damián García Olmo por su orientación en las etapas iniciales del proyecto.

Al personal del Laboratorio de Cirugía Experimental y Animalario del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz, dirigidos por el Dr. Castilla y la siempre oportuna ayuda de D. Carlos Carnero y Dña. Pilar Manzano, por soportar las largas y a veces interminables sesiones de quirófano ofreciendo siempre una cara amable.

A mis compañeros del Servicio de Cirugía de los dos hospitales en los que he estado durante la realización de este trabajo, con algunos he compartido en ambos centros y han escuchado de los “cerditos” por duplicado.

A mi familia, a mis padres por ayudarme a llegar hasta aquí y ser ejemplo, a Andrea, mi esposa, por estar a mi lado, siempre dispuesta a arrimar el hombro, y por supuesto, a mi hija Martina por aceptar las horas robadas y siempre colaborar a pesar de su corta edad en este proyecto.

## **PUBLICACIONES CIENTÍFICAS Y COMUNICACIONES A CONGRESOS RELACIONADAS CON EL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

- Comunicación tipo oral: Nuevo modelo porcino para estudio de anastomosis de alto riesgo secundario a hipoperfusión. XXXI Congreso Nacional de Cirugía 2016 - Madrid. Candidata a premio “Lo mejor del Congreso”.

- Comunicación tipo póster: Eficacia del Tachosil® para prevenir fuga anastomótica en suturas intestinales de riesgo: Estudio experimental y aleatorizado en cerdos. XXI Reunión Nacional de la Fundación Asociación Española de Coloproctología 2017 - Almería.

- Publicación científica: A new Porcine Model for the study of High-Risk Colonic Anastomoses due to Hypoperfusion. Garcia-Vasquez C, Fernández-Aceñero MJ, De-Pablo D, García Gómez de las Heras MS, Tejedor P, Pastor C. IJCAR 2018;7(7):14106-8.

Revista: International Journal of Current Advanced Research.

FI (SJIF) 2017: 6,614. ISSN: 2319-6475 (E) / 2319-6505 (P).

Indexada en: SJIFactor, Science Central, ProQuest.

- Publicación científica: Histopathological changes associated to an absorbable fibrin patch (Tachosil®) covering in an experimental model of high-risk colonic anastomoses. García-Vásquez C, Gómez García de las Heras S,

Pastor Idoate C, De Pablo D, Fernández-Aceñero MJ. *Histol Histopathol* 2018;33:299-306.

Revista: *Histology and Histopathology*.

FI 2017: 2,025. ISSN: 1699-5848 (E) / 0213-3911 (P).

Indexada en: PubMed, Medline, Scopus.

- Publicación científica: Fibrin patch influences the expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and nuclear factor- $\kappa$ B-p65 factors on ischemic intestinal anastomosis. García-Vásquez C, Fernández-Aceñero MJ, Gómez García de las Heras S, Pastor Idoate C. *Experimental Biology and Medicine* 2018; 243: 803–808.

Revista: *Experimental Biology and Medicine*.

FI 2017: 2,413. ISSN: 1535-3702 (E) / 1535-3699 (P).

Indexada en: PubMed, Medline.

## ACREDITACIONES Y CERTIFICACIONES OBTENIDAS PARA LA REALIZACIÓN DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

- El presente trabajo ha obtenido la certificación de viabilidad por parte de la Comisión de Investigación del Instituto de Investigación del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz con el número de registro: 90/2011. (Anexo 1)
- Se ha obtenido la aprobación por parte del Comité Ético de Experimentación Animal del Instituto de Investigación del Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz con el número de registro: 45/2011. (Anexo 2)
- El proyecto de cirugía experimental en animales ha sido inscrito en el Registro de la Comisión de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio de la Comunidad de Madrid, siendo aprobado por la Dirección General de Medio Ambiente, según normativa vigente en RD. 53/2013, con el número de referencia: 10/010286.9/14. (Anexo 3)
- **Conflictos de interés:** Los autores del trabajo declaran tener ninguna relación laboral con dicha empresa llevando a cabo la investigación de forma independiente.

## ABREVIATURAS

- ASA: Asociación Americana de Anestesiistas.
- GC: Grupo control.
- EMA: Agencia Europea del Medicamento.
- EPAR: Informes de la Agencia Europea de Medicamento.
- EPO: Eritropoyetina.
- SF: Sellante de fibrina.
- HIF: Factor inducible por hipoxia.
- HIF 1: Factor inducible por hipoxia 1.
- HIF-1 $\alpha$ : Subunidad alfa del factor inducible por hipoxia.
- HIF-1beta: Subunidad beta del factor inducible por hipoxia.
- IHQ: Inmunohistoquímica.
- IL-1 $\beta$ : Interleucina-1 beta.
- NF- $\kappa$ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.
- NF- $\kappa$ B-p65: Subunidad p65 del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.
- SISG: Grupo de Estudio de la Infección Quirúrgica del Reino Unido.
- TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa.
- VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular.



# INDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>21</b>
1.1 ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA.....	21
1.2 ANASTOMOSIS DIGESTIVAS .....	22
1.2.1 <i>Clasificación de las anastomosis digestivas</i> .....	23
1.2.1.1 Según los extremos involucrados.....	24
1.2.1.2 Según la orientación de los extremos unidos .....	25
1.2.1.3 Según la técnica empleada. ....	26
1.2.2 <i>Biología de las anastomosis intestinales</i> .....	31
1.2.2.1 Anatomía microscópica del tubo digestivo .....	31
1.2.2.2 Proceso de cicatrización en el intestino.....	33
1.2.3 <i>Factores que influyen sobre la anastomosis</i> .....	36
1.2.3.1 Factores sistémicos .....	37
1.2.3.2 Factores locales.....	41
1.2.3.3 Factores técnicos.....	43
1.3 LA DEHISCENCIA DE SUTURA O FALLO ANASTOMÓTICO .....	44
<i>Adaptado de: Dindo et al. Ann Surg 2004.</i> .....	46
1.3.1 <i>Incidencia del fallo anastomótico</i> .....	47
1.3.2 <i>Medidas preventivas ante el fallo anastomótico</i> .....	47
1.3.2.1 Ostomia derivativa .....	47
1.3.2.2 Ileostomía virtual.....	48
1.3.2.3 Adhesivos o parches biológicos .....	49
1.3.2.4 Terapia con células madre .....	49
1.4 ADHESIVOS TISULARES Y BIOLÓGICOS .....	50
1.4.1 <i>Tachosil®</i> .....	53

1.5 ASPECTOS MOLECULARES DE LA RESPUESTA A LA HIPOXIA Y LA INFLAMACIÓN EN RELACIÓN CON LA CICATRIZACIÓN .....	54
1.5.1 Factor Inducible por hipoxia (HIF) .....	54
1.5.2 Factor nuclear kappa B .....	56
1.6 EL CERDO COMO MODELO EXPERIMENTAL .....	56
<b>2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO .....</b>	<b>61</b>
<b>3. HIPÓTESIS .....</b>	<b>65</b>
3. HIPÓTESIS DEL ESTUDIO .....	65
<b>4. OBJETIVOS .....</b>	<b>69</b>
4.1 OBJETIVO PRINCIPAL: .....	69
4.2 OBJETIVOS SECUNDARIOS .....	69
<b>5. MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>73</b>
<b>COMPENDIO DE PUBLICACIONES .....</b>	<b>73</b>
5.1 PRIMERA PUBLICACIÓN: .....	73
5.2 SEGUNDA PUBLICACIÓN: .....	79
5.3 TERCERA PUBLICACIÓN:.....	91
<b>6. RESULTADOS GLOBALES.....</b>	<b>101</b>
<b>7. DISCUSIÓN.....</b>	<b>105</b>
7.1 MODELO EXPERIMENTAL DE ANASTOMOSIS CRÍTICA .....	105
7.2 EFECTOS CLÍNICOS DEL TACHOSIL®.....	106
7.3 OTROS EFECTOS HISTOPATOLÓGICOS DEL TACHOSIL® .....	107
7.4 EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA HIPOXIA Y LA INFLUENCIA DEL TACHOSIL.....	108
<b>8. LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>113</b>
8.1 LIMITACIONES .....	113
8.2 PERSPECTIVAS FUTURAS .....	114
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>117</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>119</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>135</b>

Anexo 1: Informe de la Comisión de Investigación .....	137
Anexo 2: Informe Comité Ético de Experimentación Animal.....	139
Anexo 3: Informe de la Comisión de Medio Ambiente .....	141
Anexo 4: Presentación resumen de la comunicación oral .....	143
Anexo 5: Poster.....	145

## **INTRODUCCION**

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Antecedentes y estado actual del tema

La intuición de unir heridas, tejidos y anastomosis con colas o pegamentos es posiblemente uno de los planteamientos más antiguos en la historia de la medicina. Hacia el año 1100 a.C. los egipcios desarrollaron una gran variedad de adhesivos que incluían la goma de acacia y muchos tipos de resinas vegetales. En el Papiro Quirúrgico de Edwin Smith, escrito en el 1700 a.C. probablemente por el médico egipcio Imhotep, se describe el cierre de lesiones con una sustancia consistente en una mezcla de cebada, avena y miel. También se sabe que las heridas practicadas durante el embalsamamiento no eran suturadas, siendo recubiertas con cera de abejas.

Durante el siglo XIX y principios del siglo XX grandes cirujanos como Travers<sup>1</sup>, Lembert<sup>2</sup>, Connell<sup>3</sup> o Halsted<sup>4</sup> establecieron los principios básicos de las anastomosis intestinales; desde entonces y hasta fechas recientes la sutura manual se ha mantenido como el método estándar a la hora de unir dos segmentos intestinales. En las últimas décadas las anastomosis mecánicas o realizadas con grapadora han ido ganando terreno, particularmente en aquellas zonas donde el requerimiento técnico es mayor como es el caso de las uniones esofagoyeyunales o las colorectales. Dichos sistemas mecánicos son relativamente recientes. En 1921 el cirujano alemán von Petz presentó un instrumento que consistía en una pinza gigante de Payr, que transportaba dos filas de ganchos contruidos en plata, que se cargaban con la mano y que de forma secuencial iban penetrando en los tejidos mediante la rotación de una rueda. Friedrich, otro cirujano relevante de la época, logró uno de los avances más importantes al introducir cartuchos intercambiables donde podían ser recargados a mano los ganchos, permitiendo el uso repetido del mismo instrumento durante la cirugía. Sin embargo, es en Moscú donde se produjo un

fuerte impulso al desarrollo de instrumentos de sutura mecánica, el primero de los cuales se atribuye a Gudov para las anastomosis vasculares. Posteriormente se desarrolló toda una gama de grapas, instrumentos para el cierre del aparato digestivo, para las anastomosis muco-mucosas con invaginación o para las suturas sero-serosas de asas contiguas de intestino delgado, así como otros instrumentos para el cierre y sección del estómago.

## **1.2 Anastomosis digestivas**

Desde el punto de vista más amplio, en las ciencias biológicas, se define el termino “anastomosis” como la unión de unos elementos anatómicos con otros en la misma planta o del mismo animal. La unión de segmentos del tubo digestivo, con el objetivo de restituir o derivar el tránsito intestinal, constituye como ya se ha mencionado un elemento esencial e imprescindible en la cirugía digestiva. Dicha unión debe permanecer estanca y permeable con buen paso a su través de forma estable en el tiempo, ya que de no ser así se presentan complicaciones como la dehiscencia anastomótica con vertido de contenido intestinal a la cavidad abdominal o la obstrucción del tránsito intestinal por estenosis de la anastomosis.

Teniendo en cuenta esto, se han descrito principios generales para tener en cuenta a la hora de realizar una anastomosis con el objeto de minimizar el riesgo de complicaciones inmediatas y a largo plazo:<sup>5</sup>

- Conseguir un medio de cohesión adecuado, para ello se requiere promediar el número suficiente de puntos o medios de sujeción (grapas) a lo largo de la longitud de la anastomosis.
- Conseguir afrontar la capa serosa de ambos segmentos intestinales en el mismo plano para formar una unión sólida lo más rápido posible.

- Prevenir y cohibir la hemorragia de la pared intestinal durante la confección de la anastomosis.
- Aproximar los bordes seccionados para evitar la estenosis cicatricial y evitar la tensión en la línea de sutura.
- Comprobar una correcta vascularización en los segmentos intestinales que vayan a ser anastomosados.

Casi todos los segmentos del tubo digestivo son similares en sus capas: mucosa, submucosa, muscular y serosa. Desde los tiempos de Halsted, se ha insistido que la submucosa es el elemento más sólido de la pared intestinal en la confección de una sutura.<sup>4</sup> Efectivamente, este plano es una lámina consistente formada por abundante tejido conjuntivo muy bien vascularizado, a diferencia de la mucosa que es frágil, y sin consistencia para la sutura.

La capa muscular es otra de las capas que presentan resistencia. Sin embargo, su grosor no es similar en todo el tracto digestivo por lo que algunos segmentos son fáciles de suturar y otros más difíciles. El estómago es el órgano ideal para realizar suturas porque su muscular tiene un considerable espesor. El duodeno es más difícil de suturar, dado que su musculatura es delgada y se encuentra fijo al retroperitoneo por lo que la tensión que suele utilizarse en los puntos puede dislacerar las capas. El intestino delgado tiene una muscular muy delgada igual que el duodeno, pero las anastomosis y suturas casi nunca quedan tirantes por su movilidad, aunque pueden plantear problemas por estenosis. El colon tiene buena resistencia a la sutura, salvo que esté adelgazado por dilatación. Hay dos órganos que presentan deficiencias estructurales importantes para ser suturados: el esófago y el recto extraperitoneal, ya que carecen de revestimiento seroso lo que impide una buena resistencia para la anastomosis en el plano seromuscular.<sup>6</sup>

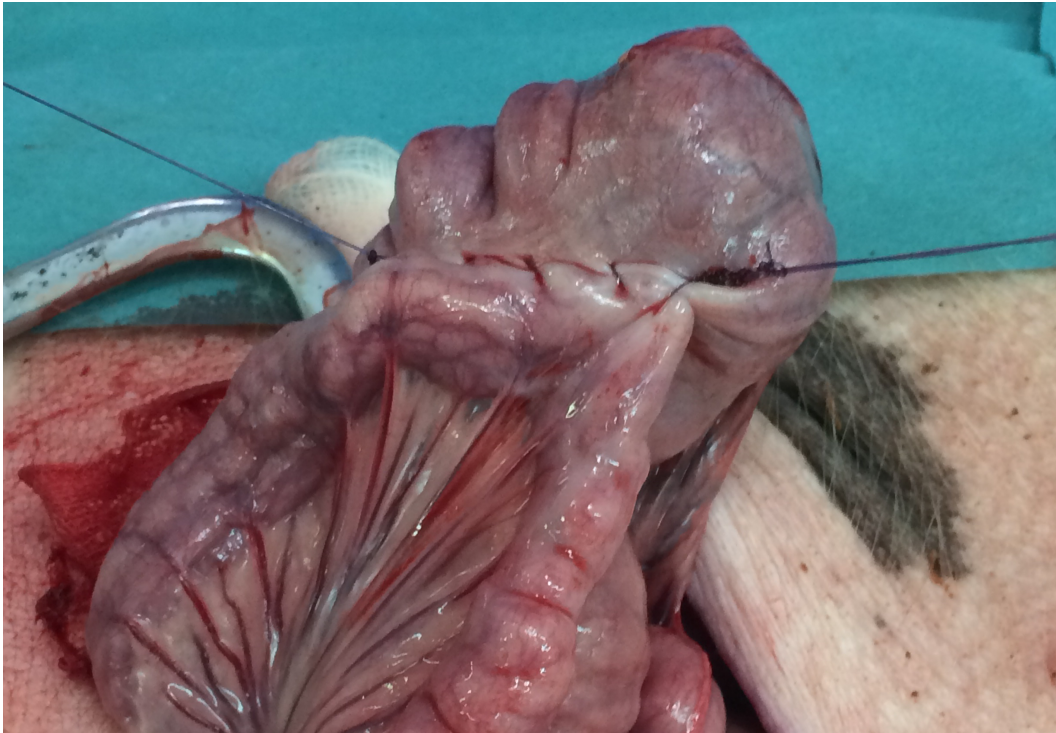
### **1.2.1 Clasificación de las anastomosis digestivas**

Las anastomosis pueden ser clasificadas atendiendo a diversos criterios, como por ejemplo, los segmentos que conforman la unión, la forma y dirección en los que se abocan los extremos, y la técnica que empleemos para su confección, quizá el criterio más importante.

#### *1.2.1.1 Según los extremos involucrados*

- Esófago-gástrica
- Esófago-yeyunal
- Colo-esofágica
- Colecisto-duodenal
- Colecisto-yeyunal
- Gastro-duodenal
- Gastro-yeyunal
- Ileo-cólicas (figura 1)
- Intestinales
- Colónicas
- Colo-rectales
- Colo-anales
- Ileo-anales





**Figura 1: Anastomosis ileocólica sobre modelo experimental.**

**Fuente: Imagen propia.**

Esta forma de clasificación es descriptiva y orientativa desde el punto de vista anatómico, pero menos relevante desde el punto de vista clínico, ya que otros factores, como por ejemplo la altura del recto donde se realiza la unión, son más determinantes de la evolución postoperatoria.

#### *1.2.1.2 Según la orientación de los extremos unidos*

- *Termino-terminales*: como su nombre indica, se unen de forma continua las bocas de ambos extremos (distal y proximal) de los segmentos a unir; presenta una importante limitación en el caso de vísceras de diferente tamaño.
- *Latero-laterales*: unión de la pared lateral de ambos extremos. Permite ajustar el tamaño de la anastomosis a lo que se considere indicado, por lo que



**Figura 2: Presentación latero-lateral de bordes anastomóticos sobre modelo experimental.**

**Fuente: Imagen propia.**

resulta particularmente útil en la unión de vísceras de diferente calibre y en la confección de anastomosis mecánicas con grapadora lineal (figura 2).

- *Termino-laterales o latero-terminales*: aportan las ventajas de las uniones latero-laterales, pero limitan el calibre de la unión al extremo terminal a unir. Es útil en la confección de anastomosis mecánicas utilizando instrumento de grapado circular.

#### **1.2.1.3 Según la técnica empleada.**

Se divide en dos grupos:

- Anastomosis manuales:

- Puntos sueltos versus sutura continua

Habitualmente se emplean ambos tipos de sutura y en la actualidad depende más de las preferencias personales del cirujano ya que no existe evidencia concluyente que demuestre superioridad de una forma sobre la otra.<sup>7-</sup>

<sup>9</sup> Los defensores de la sutura continua (figura 3) argumentan un menor tiempo quirúrgico y reducción de costes, mientras que aquellos que abogan por la sutura a puntos sueltos refieren una menor isquemia en los bordes de la anastomosis.

- Monoplano versus doble plano de sutura

Otra fuente de controversia entre cirujanos. Ambas presentan sus teóricas ventajas y deficiencias. La anastomosis en dos planos se caracteriza por una capa interna que involucra a la submucosa, para enfrentar e invertir los bordes y una capa sero-serosa con la intención de aumentar la estanqueidad y disminuir la tensión sobre la línea interna. Inicialmente la anastomosis con sutura en doble plano parecía la más adecuada, asegura una mejor hemostasia, impermeabilidad y gran solidez, pero a costa de realizar una anastomosis invertida, con mayor riesgo de isquemia y estenosis.<sup>6</sup>

Para obviar los problemas que acompañan a la sutura en dos planos se propuso la técnica monoplano, fundamentalmente defendida por la escuela francesa. Sus objetivos son: evitar las grandes inversiones, sin rodetes que propicien la estenosis, y permitir que los vasos alcancen y atraviesen la anastomosis evitándose así la isquemia de ésta. Es evidente que para conseguir estos objetivos la sutura monoplano ha de hacerse preferentemente con puntos sueltos. Los puntos pueden ser extramucosos o totales, en cuyo caso se produce un pequeño grado de invaginación.<sup>10</sup>



**Figura 3: Detalle de sutura manual continua sobre modelo experimental.**

**Fuente: Imagen propia.**

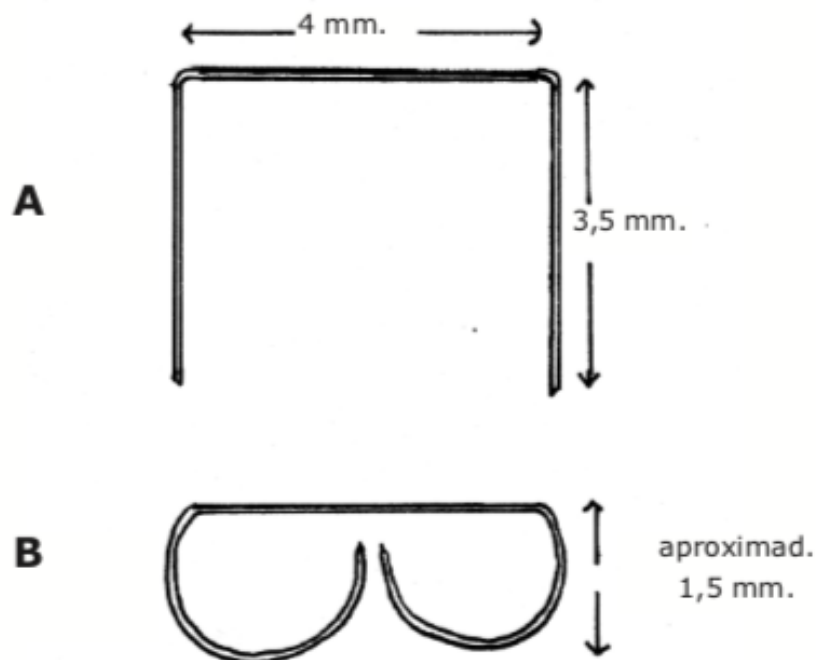
- Anastomosis mecánica:

El fundamento del empleo de los aparatos mecánicos de sutura se basa en el principio de sustituir la sutura manual por la realizada por una maquina lo que a priori aporta una mayor exactitud y uniformidad que la posible mediante una técnica manual, y adicionalmente actuando más rápido, con objetivo de acortar el tiempo operatorio. Esta técnica también es mucho más simple y cómoda para el cirujano.

Los aparatos de sutura mecánica tanto lineales como circulares fueron inicialmente desarrollados en Rusia en la década de 1960. Veinte años más tarde serían reinventados y perfeccionados en los Estados Unidos de América, desarrollándose lo que conocemos actualmente como las dispositivos de grapado intestinal.

Tanto los aparatos rusos reutilizables como los americanos de un solo uso permitían realizar todo tipo de anastomosis con rapidez, limpieza y hermetismo, impidiendo la salida del contenido intestinal, por lo que puede hablarse de anastomosis asépticas cerradas. Habida cuenta de la buena tolerancia a las grapas, la reacción inflamatoria es mínima.

Las grapas, al tener forma en B tridimensional (figura 4), no alteran la vascularización de la anastomosis, pues no ocluyen las arterias intramurales como lo hacen los nudos en las suturas manuales. Pero también es cierto que dichas arterias con cierta frecuencia sangran produciendo hemorragias digestivas. Sin embargo, las anastomosis con aparatos mecánicos reducen el tiempo operatorio, así como la fase séptica de toda intervención sobre el tracto digestivo. Además, permiten realizar anastomosis más altas o más bajas tanto en el esófago como en el recto, alcanzando niveles en los que técnicamente la anastomosis manual es imposible o extraordinariamente dificultosa.



**Figura 4: Forma estandarizada de grapa intestinal.**

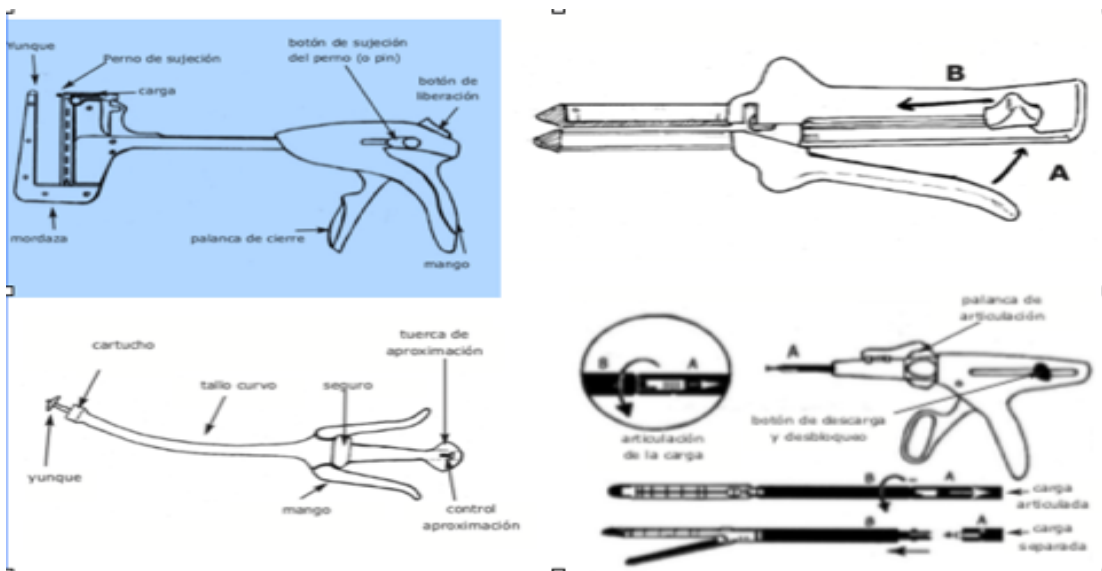
**Adaptado de: ARTUSI G et al; Suturas mecánicas en cirugía digestiva. 2009.**



Las dispositivos más utilizados en la actualidad se pueden dividir en tres grupos, cada uno de los cuales contiene equipos de diferentes fabricantes y con sutiles diferencias, pero con un principio básico de funcionamiento similar (figura 5):

1) TA<sup>®</sup> (toraco-abdominal): consiste en dos ramas con forma de “L” acopladas. Las ramas verticales se deslizan una sobre la otra cuando se rota un tornillo ubicado en la cabeza del instrumento, con lo que se aproximan las ramas horizontales; en la rama superior se encuentra el cartucho removible con las grapas y en la inferior está el yunque que da la forma definitiva a las grapas.

2) GIA<sup>®</sup> (Gastrointestinal Anastomoses): presenta dos ramas largas, que transportan el cartucho de grapas y el yunque descartable. Se presenta en múltiples alturas de grapa y longitudes, así como dispositivos creados para la cirugía abierta y otros para laparoscopia. Cuando las dos mitades del instrumento están acopladas y el sistema es activado, se introducen dos o tres hileras de grapas alternas que unen los extremos intestinales por suturar



**Figura 5: Grapadoras intestinales. De izquierda a derecha: TA, GIA, EEA y EndoGIA.**

**Adaptado de: ARTUSI G et al; Suturas mecánicas en cirugía digestiva. 2009.**

mientras que la cuchilla secciona los tejidos existentes entre la mitad de las hileras de grapas. Por lo tanto, secciona y confecciona una anastomosis en un solo tiempo.

3) Circular o EEA®: instrumento tubular parecido a un sigmoidoscopio que en un extremo tiene un mango que sirve para activar el instrumento y un sistema giratorio que permite aproximar o separar las grapas del yunque, que está ubicado en la otra mitad del cartucho. Los segmentos por anastomosar son aproximados con vueltas del tornillo del mango. La compresión del mango empuja de forma simultánea la doble fila de grapas y la cuchilla circular, que corta el doble diafragma formado por las dos bolsas de tabaco anudadas sobre los extremos intestinales, con lo que se confecciona, en forma instantánea una anastomosis término-terminal invaginante.

## **1.2.2 Biología de las anastomosis intestinales**

### *1.2.2.1 Anatomía microscópica del tubo digestivo*

El tubo digestivo, salvo en sus segmentos extraperitoneales (esófago y recto), está formado por cuatro capas, de intraluminal a externa: mucosa, submucosa, muscular y serosa (figura 6).

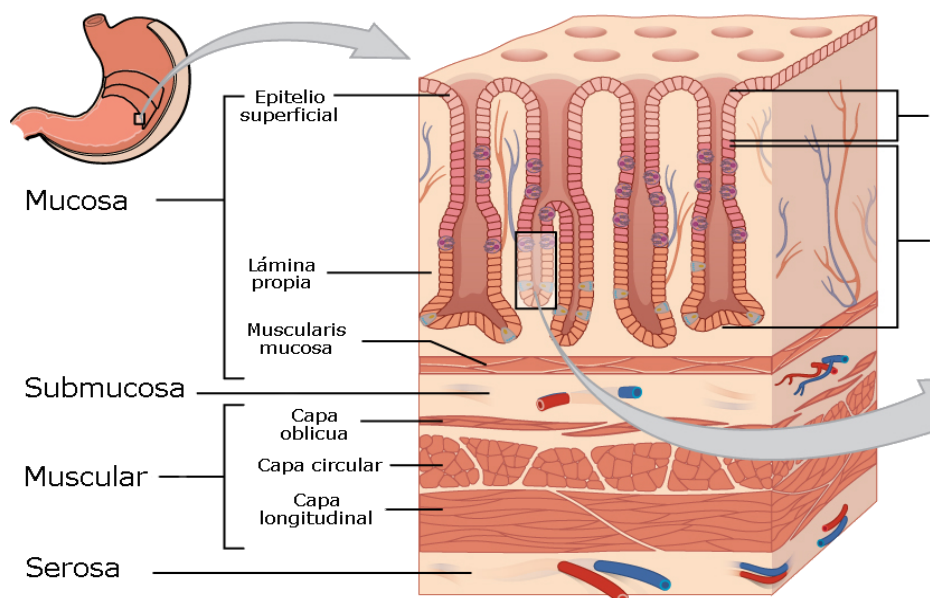
1) Serosa: es la capa más externa, se compone de una delgada capa de tejido conjuntivo que cubre la muscular externa y está cubierta en su cara exterior por el revestimiento mesotelial de la cavidad peritoneal. Proporciona protección ante la dehiscencia y fuga anastomótica, siendo evidente en los extremos que pierden el recubrimiento seroso (recto y esófago) que presentan un mayor riesgo de fallo de la sutura.<sup>11</sup>

2) Muscular: excepto en el estómago, se compone por dos capas, la externa o longitudinal y la interna o circular. De su contracción sincronizada

nacen los movimientos peristálticos que permiten la propulsión del alimento. Entre ambas capas se localiza el plexo mientérico de Auerbach.

3) Submucosa: está formada principalmente por fibras de colágeno y elastina entrelazadas, junto con un plexo submucoso de fibras nerviosas, ganglios y vasos sanguíneos y linfáticos. En el colon tanto los fibroblastos como las células de músculo liso poseen capacidad de producción de colágeno.<sup>12</sup> La submucosa aporta la mayor parte de la resistencia tensil, representando el plano clave en la fijación de los puntos de sutura o grapas.<sup>4</sup>

4) Mucosa: formada a su vez por tres subcapas, constituye el revestimiento interno de la luz intestinal. Dichas capas son el epitelio, lámina propia y muscularis mucosae. El epitelio del intestino grueso se compone de células caliciformes y cilíndricas, mientras que la membrana basal está compuesta principalmente por colágeno tipo IV. La lamina propia es una capa de tejido conjuntivo que sostiene al epitelio y facilita la absorción y secreción formada por colágeno tipos I, III, V y elastina, contiene vasos sanguíneos, linfáticos y las células mesenquimales e inflamatorias.<sup>13</sup> La muscularis mucosae es una lámina delgada de músculo liso que separa la lámina propia



**Figura 6: Esquema de la mucosa gástrica, se muestra la distribución general aplicable al resto de segmentos intestinales.**

**Adaptado de: WIKIMEDIA COMMONS. OpenStax College.**



de la submucosa. Tras una anastomosis, la mucosa puede recuperar su estanqueidad en 3-4 días.<sup>14</sup>

#### *1.2.2.2 Proceso de cicatrización en el intestino*

El proceso de cicatrización de la anastomosis sigue las mismas fases catabólica, anabólica y de maduración definitiva del colágeno que en el resto de tejidos en organismo.<sup>14, 15</sup> La capa submucosa, en gran parte por su alto contenido de fibras de colágeno, es la determinante en el proceso de cicatrización de las anastomosis del tubo digestivo, sobre todo entre el cuarto y séptimo día, en los que la cantidad de colágeno aumenta de forma logarítmica.<sup>15</sup> En general, extrapolando al modelo de cicatrización por el que pasan todos los tejidos al intestino, podemos dividir el proceso en las ya mencionadas etapas específicas, que se solapan tanto en el tiempo como en la actividad. La respuesta inmediata a la lesión intenta limitar la extensión de la misma y evitar nuevos daños, es lo que se conoce como fase inflamatoria. La fase regenerativa o reparadora consiste en un proceso de reparación con epitelización, síntesis de matriz y neovascularización. La fase final de maduración o remodelación es un periodo de contracción de la cicatriz con formación de enlaces cruzados de colágeno, contracción y desaparición del edema.<sup>16</sup>

El aporte de oxígeno es fundamental para la correcta cicatrización, ya que es un requisito indispensable para la hidroxilación de la lisina y la prolina durante la síntesis del colágeno. El volumen sanguíneo, la función cardiopulmonar y la perfusión tisular local (dependiente tanto de la microvascularización del lecho como de los vasos distantes de la arcada intestinal) son los mecanismos fisiológicos que regulan el aporte de oxígeno a los extremos anastomóticos, por lo que en situaciones de bajo flujo o hipoperfusión la cicatrización puede verse alterada al reducirse la presión tisular de oxígeno, contribuyendo al fallo de la anastomosis.<sup>17</sup> Al igual que en el resto del organismo, en el tubo digestivo existen mecanismos de autorregulación intrínsecos por los que se mantiene el aporte de oxígeno local, gracias a una redistribución del flujo sanguíneo en la pared del intestino, en situaciones de disminución de la presión de perfusión basal.<sup>18</sup>

Durante los primeros 3 a 4 días que siguen a una anastomosis intestinal y durante la mencionada fase inflamatoria, la integridad de la misma depende totalmente de la sutura y del sello de fibrina que se forma en el lado seroso que evita la fuga por la línea de sutura. La fuerza tensil inicial de la anastomosis y su pérdida a través del tiempo es similar en el esófago, duodeno y el colon, siendo diferente en el intestino delgado cuya pérdida es menor, esto implica que pueden existir diferencias en la calidad del tejido conjuntivo con la que se reparan las distintas regiones intestinales, especialmente cuando se compara la curación entre el íleon y el colon donde se han observado diferencias en el tiempo de cicatrización, la secuencia y magnitud de los cambios bioquímicos. Así por ejemplo, se ha observado que el colágeno contenido en la línea anastomótica se deposita en forma más temprana en el colon que en el intestino delgado. Cabe recordar que el plano mucoso a nivel del tracto gastrointestinal es reparado por migración e hiperplasia de las células epiteliales para cubrir el defecto, esta acción de las células epiteliales cubriendo el tejido de granulación y formando una barrera biológica para el contenido intestinal. Además de contribuir en el ya

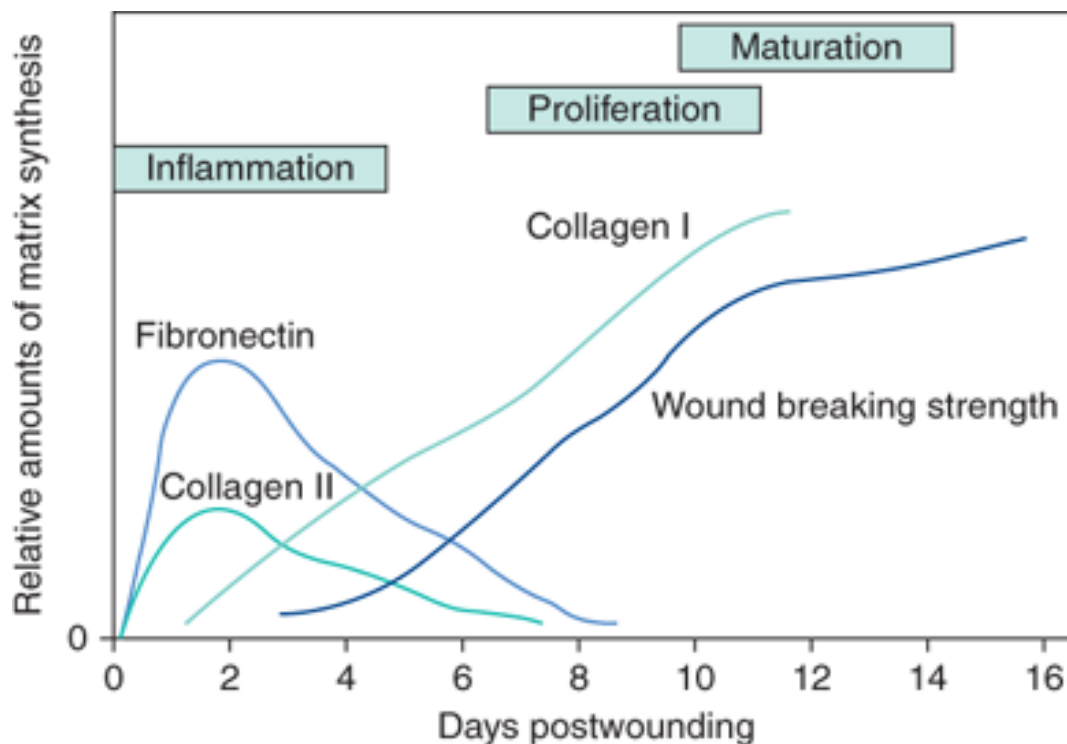
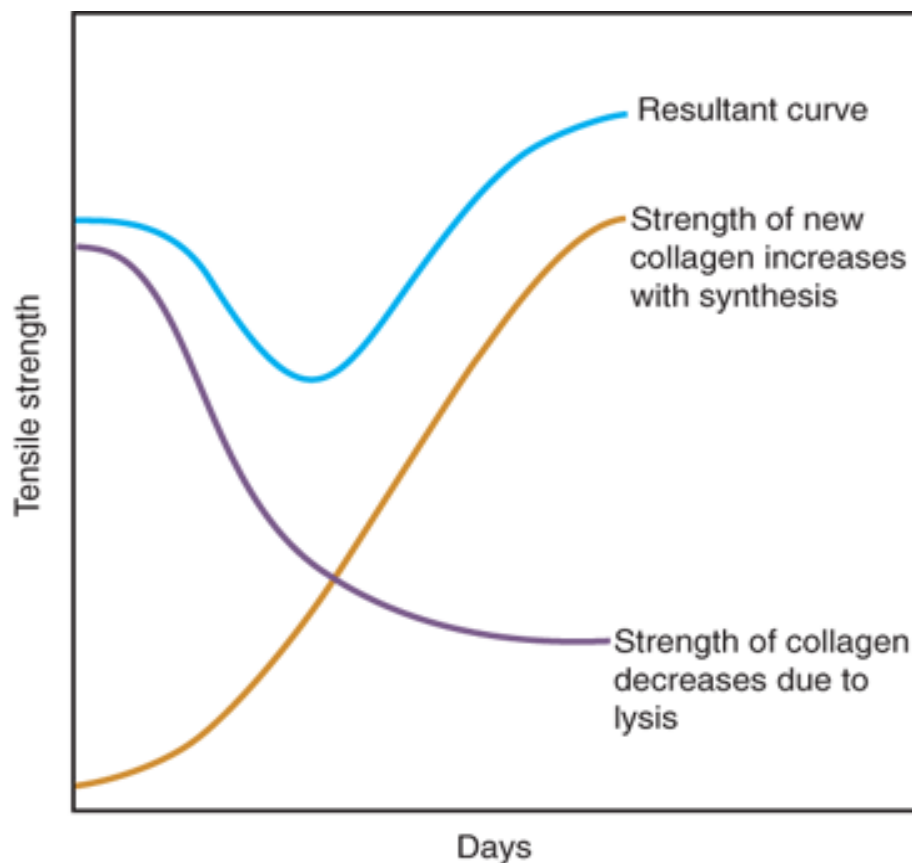


Figura 7: Evolución del colágeno en la cicatrización intestinal.

Adaptado de: Doherty et al. Current Diagnosis and Treatment. 14ª. McGraw Hill.

mencionado sellado de la unión, posiblemente también inhibe la inflamación y el crecimiento excesivo de tejido conjuntivo que podría obstruir la anastomosis.

Los cirujanos conocemos este tiempo crítico en la integridad de una anastomosis durante los primeros días debido a la pérdida de cohesión en el borde del intestino anastomosado. Se ha sugerido que esta pérdida es consecuencia del aumento de la actividad colagenolítica en el borde de la anastomosis alrededor del tercer día del postoperatorio (figura 7).<sup>19, 20</sup> Este importante fenómeno que altera la cicatrización y dicho depósito de colágeno parece estar relacionado con los neutrófilos que se acumulan de manera temprana en los bordes de la herida. Se sugiere que la presencia de radicales libres de oxígeno o proteinasas mediadas por los neutrófilos causan degradación de las fibras de colágeno, disminuyendo la fuerza tensil de la unión (figura 8).



**Figura 8: Relación entre síntesis-degradación del colágeno y la fuerza tensil.**

**Adaptado de: Bardul A et al. Schwartz's Principles of Surgery, 10º. McGraw Hill.**

Se considera entonces, que cuando ocurren complicaciones en la anastomosis como la dehiscencia, o fugas, estas son causadas por isquemia, infección local o trauma que son los factores que aumentarían la cantidad de neutrófilos alrededor de la anastomosis y causarían la degradación excesiva del colágeno. Por el contrario, los inhibidores de las proteinasas y los liberadores de radicales libres de oxígeno tienen un efecto benéfico en mantener la fuerza de cohesión sobre los bordes de la herida en forma temprana. A partir del tercer y cuarto día del postoperatorio se observa un notable aumento en la síntesis de colágeno que rodea a la anastomosis, ganando esta rápidamente fuerza mientras que las suturas pierden la capacidad de mantener juntos los bordes de la pared Intestinal, haciendo estas innecesarias 1 o 2 semanas después del procedimiento.

### **1.2.3 Factores que influyen sobre la anastomosis**

Una anastomosis segura e infalible es una de las principales metas en la cirugía digestiva. A pesar de intervenir en condiciones ideales, los estudios demuestran una tasa de fuga que según el sitio anatómico puede variar entre el 3-7% en el caso de las anastomosis de colon hasta el 10-20% en el caso de resección rectal.<sup>21, 22</sup> Debido a las importantes consecuencias del fallo anastomótico para el paciente en términos de morbilidad, existen numerosos trabajos que intentan encontrar factores de riesgo independientes para el desarrollo de fuga con el fin de prevenirla o si ya está presente, diagnosticarla de forma precoz.<sup>23</sup> En el caso de las anastomosis cólicas intraperitoneales se ha demostrado que la fuga anastomótica se asociaba en el análisis univariante a factores como la radioterapia previa, el grado ASA, leucocitosis, fallo renal, tratamiento con esteroides, duración de la intervención, sepsis intraoperatoria, la realización de una colectomía total o transversa, presencia de dificultad intraoperatoria, anastomosis ileorrectal o ileocólica, drenaje abdominal y transfusión sanguínea perioperatoria.<sup>24</sup> Sin embargo, en el

análisis multivariante se observaron que la leucocitosis preoperatoria, la construcción de anastomosis en el contexto de sepsis del paciente, la anastomosis tipo colo-cólica o colo-rectal y la transfusión postoperatoria fueron factores asociados de forma independiente a la presencia de fallo anastomótico.<sup>24</sup>

Para alcanzar estos objetivos, la sutura gastrointestinal debe cumplir ciertos requerimientos o factores, que podemos dividir como: factores sistémicos, factores locales y factores técnicos. Los estudios experimentales y clínicos habitualmente se han enfocado en determinar estos factores en forma aislada tratando de encontrar su relación con las complicaciones.

#### *1.2.3.1 Factores sistémicos*

a) Edad: Entre los factores sistémicos que contribuyen a las complicaciones de las anastomosis, uno de los más importantes es la edad. Clínicamente se ha demostrado que la incidencia de dehiscencia en las anastomosis colónicas en pacientes entre 60-80 años ha sido mayor (hasta de un 22%), lo que se explica por múltiples factores asociados a la edad incluyendo la desnutrición, aterosclerosis, trastornos cardiovasculares y la existencia de malignidad.<sup>25, 26</sup> Se ha identificado que el riesgo aumenta a partir de los 75 años.<sup>27, 28</sup> A pesar de ello, también existen trabajos que no confirman dicha relación,<sup>29</sup> aunque la balanza de la evidencia disponible parece inclinarse hacia el aumento de riesgo de dehiscencia edad-dependiente.

b) Sexo: El sexo masculino ha sido descrito como un factor de riesgo independiente para el desarrollo de fallo anastomótico. Los estudios que describen esta relación entre el sexo y la fuga anastomótica incluyen anastomosis bajas de recto, en las que, dado que la pelvis masculina es más estrecha, la disección y anastomosis son técnicamente más complejas.<sup>30, 31</sup> Incluso hay trabajos que refieren un riesgo aumentado hasta 2,3 veces de desarrollar una fuga anastomótica en relación al sexo masculino.<sup>23</sup> A pesar que la experiencia quirúrgica abala la teoría de la dificultad técnica de la pelvis masculina como responsable de la mayor tasa de fugas, también es cierto que

existen trabajos que incluyen únicamente anastomosis colónicas y encuentran peores resultados en cuanto a frecuencia de presentación del fallo anastomótico en varones, por lo que la explicación anatómica no debe de ser la única razón.<sup>21</sup>

32

c) Desnutrición: La desnutrición se relaciona con un deterioro de la calidad de vida, como factor de dehiscencia y fuga anastomótica es conocida desde la primera mitad del siglo XX.<sup>33</sup> Podemos definir la desnutrición preoperatoria como la pérdida reciente de peso mayor a 5 Kg en los 3 meses previos acompañada de niveles de albúmina inferiores a 3,5 g/dl, asociándose dichos factores con un aumento en el riesgo de presentar fallo anastomótico.<sup>24</sup> Se ha descrito, en un estudio retrospectivo de 993 pacientes, que unos niveles preoperatorios de hemoglobina menor a 9,4 g/dl, junto con niveles de proteínas totales séricas <5,5 g/dl se asocian a un mayor riesgo de fallo anastomótico.<sup>34</sup> Aunque se ha demostrado que la suplementación nutricional mejora la situación general de los pacientes, incluyendo la función pulmonar y la resistencia a la Insulina, todavía no se ha probado de manera inequívoca una mejoría en la tasa de fuga anastomótica o en la duración del ingreso hospitalario.<sup>35</sup>

Además de la deficiencia proteica, la de vitaminas tiene importancia, especialmente la vitamina "C" o "ácido ascórbico" por ser un importante cofactor en la conversión de la prolina en hidroxiprolina, parte constituyente de las fibras de colágeno. La vitamina A ha sido asociada a efectos benéficos durante la cicatrización de las anastomosis del colon, especialmente cuando los pacientes han recibido radioterapia preoperatoria.

Se han desarrollado varios cuestionarios para evaluar el estado nutricional, uno de ellos es el "Malnutrition Universal Screening Tool" (MUST), han demostrado utilidad para determinar el estado de desnutrición y predecir posibilidad de complicaciones en el caso de cirugía cardiaca pero aún es necesaria más evidencia en el caso de la cirugía digestiva (tabla 1).<sup>36</sup>

TABLA 1

Cuestionario MUST de valoración nutricional

<b>Cuestionario MUST</b>	
<b>Ítem</b>	<b>Puntos</b>
IMC	
>20	0
18,5-20	1
< 18,5	2
Pérdida de peso no planificada en 6 meses	
<5%	0
5%-10%	1
>10%	2

Interpretación:

- 0: sin riesgo de desnutrición.
- 1: riesgo medio de desnutrición.
- >2: alto riesgo de desnutrición

Fuente: Adaptado de van Vugt et al.

d) La obesidad ha sido descrita como otro posible factor de riesgo de fallo anastomótico. La existencia de un mesenterio corto y grueso, así como la mayor dificultad para manipular la pared abdominal, el resto de vísceras y el intestino, incluidas las maniobras necesarias para confeccionar los cabos anastomóticos en pacientes obesos, han sido las razones por las que algunos estudios han relacionado la obesidad con la fuga anastomótica.<sup>31, 37, 38</sup> Sin embargo, existen otros trabajos donde esa relación no se confirma.<sup>39, 40</sup>

e) Estado hemodinámico: La anemia, asociada a una pérdida aguda de sangre tiene consecuencias negativas en la cicatrización y aunque la volemia sea restituida, la fuerza tensil de la anastomosis no se recupera y el peligro de dehiscencia es mayor.<sup>35</sup> La necesidad de transfusiones intraoperatorias ha sido presentada como un factor importante del fallo anastomótico, al producir una reducción de la viscosidad sanguínea por hemodilución ya que ella mantiene las tensiones de oxígeno en condiciones normales en los bordes intestinales. En cambio, la anemia normovolémica no tiene efecto alguno sobre la curación. Los efectos adversos de la hipovolemia en la cicatrización del tracto gastrointestinal pueden estar relacionados con la perfusión tisular, a la cual el colon es particularmente sensible ante los cambios de volumen sanguíneo. Una reducción del 10% en el volumen sanguíneo puede reducir la perfusión colónica en más de un 30%.

f) Oxigenación y ventilación: La hipoxia tiene un notable efecto negativo sobre las anastomosis y esta depende de un adecuado flujo de sangre arterial oxigenada. El oxígeno participa activamente en la hidroxilación de la lisina y prolina en la síntesis de colágeno, cuya producción es proporcional al nivel de PO<sub>2</sub>. El efecto general de la hipoxia es retardar la angiogénesis y la epitelización. La hiperoxigenación en cámara hiperbárica llevada a cabo en experimentos sobre ratas tiene resultados contradictorios, sin llegar a demostrar razonablemente un beneficio en anastomosis isquémicas ni con flujo sanguíneo no alterado.<sup>41, 42</sup> También existe evidencia de que el consumo de tabaco y alcohol, posiblemente debido a la alteración de la circulación microvascular que ocasiona isquemia, aumentan el riesgo de fallo anastomótico.<sup>43, 44</sup>

g) Tratamientos frecuentes en pacientes oncológicos: como los esteroides orales que se han relacionado con la fuga anastomótica, ya que por su mecanismo de acción podrían retrasar la cicatrización y han sido descritos como factor de riesgo independiente de fallo con una odds ratio de 8,7.<sup>45</sup>

h) Trastornos metabólicos: La diabetes mellitus tiene una influencia indirecta negativa sobre la cicatrización de las anastomosis por su efecto sobre la disminución de la perfusión microvascular de los bordes y todos los otros



procesos relacionados con la hiperglucemia especialmente si esta seno está controlada.

i) Clasificación ASA: Los pacientes clasificados como riesgo anestésico según escala ASA III-IV-V presentan mayor probabilidad de desarrollar fuga anastomótica, probablemente debido a la confluencia de distintas comorbilidades como diabetes, hipertensión u otras enfermedades cardiovasculares que afectan la buena perfusión sanguínea local de la anastomosis y alteran la cicatrización.<sup>40, 43, 46</sup> Existe una serie publicada en 2008 donde se encuentra un riesgo de fallo anastomótico 2,5 veces superior en pacientes con ASA III o mayor.<sup>10</sup>

#### *1.2.3.2 Factores locales*

a) Tratamiento adyuvante: Puede afectar la anastomosis tanto cuando se aplica en el preoperatorio (neoadyuvancia) o postoperatorio (adyuvancia) y su relación con perforaciones intestinales espontáneas es bien conocida. Cuando se realiza una anastomosis en un intestino previamente irradiado, la fuerza de la anastomosis está muy comprometida ya que los cambios tisulares incluyen fibrosis, obstrucción e isquemia por hialinización de los vasos sanguíneos lo que altera el balance del colágeno.<sup>47, 48</sup> Aunque existen dudas en cuanto a su relación con la fuga anastomótica, por un lado existe evidencia de que actúa como factor de riesgo, mientras que otros estudios no encuentran dicha relación.<sup>24, 39</sup> También hay que tener en cuenta que algunos fármacos cada vez más empleados, como por ejemplo el Bevacizumab, se han asociado a perforaciones intestinales por la isquemia secundaria que producen.<sup>49</sup>

b) Obstrucción: Las anastomosis que se realizan en un colon obstruido, presentan mayor riesgo de fallo. Los problemas de cicatrización en las obstrucciones intestinales parecen estar más relacionados a una alteración del riego sanguíneo, contaminación fecal y cambios en la flora bacteriana que a las alteraciones del colágeno, según se desprende de trabajos experimentales en los que la síntesis de colágeno estaba notablemente incrementada en la pared intestinal en aquellos animales con dilatación colónica después de resección de

colon izquierdo en comparación con aquellos que evolucionaron con normalidad.<sup>50</sup> Siendo así, el fallo anastomótico cabe esperar que ocurra sólo en una zona de esta como resultado de la necrosis por isquemia de la línea de sutura.

c) Infección: Por estudios clínicos y experimentales se conoce que la sepsis peritoneal tiene un efecto negativo en los bordes intestinales y también aumenta la actividad colagenolítica, factores que pueden contribuir al fallo de la anastomosis.<sup>23</sup>

d) Traumatismos: El traumatismo local relacionado con la resección de tumores localmente agresivos está relacionado a fallos anastomóticos, al igual que la cirugía realizada por lesiones directas del colon, que se asocia a una disminución en la capacidad de cicatrización produciendo con mayor frecuencia fugas y dehiscencias. Por el contrario, los traumatismos producidos a distancia tienen muy poco efecto negativo sobre las anastomosis.<sup>25</sup>

e) Microbiota intestinal: El estudio de la microbiota constituye un nuevo y apasionante campo y se están dedicando esfuerzos para entender su relación con la génesis y evolución de los tumores y más recientemente para entender su papel en las complicaciones postquirúrgicas como son, entre otras, el fallo anastomótico y el íleo paralítico postoperatorio. Al considerar la función de la microbiota intestinal para nuestra salud, es importante reconocer su funcionamiento como una comunidad altamente organizada y compleja con redes de comunicación bien establecidas que permiten el comportamiento de un grupo social.<sup>51</sup> Existen hipótesis que plantean que la fuga anastomótica es probablemente el resultado de un proceso infeccioso iniciado e impulsado por bacterias intestinales. Un estudio realizado en perros en 1954 por el cirujano estadounidense Isadore Cohen demostró que las bacterias, y no la técnica, desempeñan un papel clave y causante en la fuga anastomótica.<sup>52</sup>

Como ya se ha mencionado, la interacción entre huésped y su microbiota es de gran complejidad. Se han descrito relaciones de respuesta de los microorganismos ante agentes del huésped y viceversa y algunas pueden explicar la aparición de fuga anastomótica, como por ejemplo la capacidad de *E. faecalis*, *P. aeruginosa* y *S. marcescens* de producir colagenasas en respuesta a agentes

“agresores” del huésped, como las proteasas y citocinas inflamatorias que se producen ante la agresión quirúrgica. Estas collagenasas bacterianas pueden alterar el equilibrio entre la producción y degradación del colágeno, favoreciendo por ende el fallo de sutura.<sup>53, 54</sup> Es por esto, que en un futuro, probablemente mediante la manipulación de la microbiota intestinal sea posible reducir el número de complicaciones postquirúrgicas e incluso mejorar el pronóstico del cáncer tras su resección.<sup>55</sup>

### *1.2.3.3 Factores técnicos*

a) Vascularización: El éxito de las anastomosis está directamente relacionado con la irrigación sanguínea de sus bordes. La hemostasia del borde antes de realizar la anastomosis debe ser perfecta, pero esa hemostasia no debe generar isquemia que comprometa la oxigenación y nutrición en la línea de anastomosis.<sup>56</sup> Para ello es útil la ligadura de los vasos del mesenterio bajo transiluminación y evitar el uso del electrobisturí cerca de la línea de sutura.

b) Aposición: Afrontar frente a frente las superficies serosas para formar una unión sólida lo más rápido posible por la línea de sutura. Aproximar los bordes seccionados de la mucosa para evitar la estenosis cicatricial. Además se debe invertir la mucosa para evitar que sobresalga por la línea de sutura.<sup>25</sup>

c) Tensión: Se debe evitar la tensión en la línea de sutura mediante una correcta aposición y aproximación de los segmentos a anastomosar. Es una condición importante especialmente en las anastomosis del colon, se previene con una buena y adecuada movilización del intestino.<sup>48</sup>

d) Inversión de los bordes: Es importante para obtener una anastomosis segura invertir la mucosa en la línea de sutura. Parece ser que la ausencia de una línea continua de peritoneo y la eversión de la mucosa son factores importantes de orden técnico que favorecen la dehiscencia. La técnica utilizada para invertir la mucosa puede variar, pero en todo caso presentan una aparente utilidad.<sup>25, 48</sup>

e) Altura de la anastomosis: En las resecciones de recto, las uniones a una distancia menor de 6 cm respecto del margen anal presentan mayor riesgo de fallo independientemente de la presencia o no de otros factores de riesgo.<sup>57</sup>

f) Cirujano y técnica quirúrgica: Las anastomosis con suturas necesitan una curva de aprendizaje. Múltiples estudios demuestran que los grupos de especialistas en Cirugía Colorrectal obtienen mejores resultados en morbilidad y mortalidad que en los grupos no especializados.<sup>58, 59</sup> Se ha descrito una mayor incidencia de resecciones y anastomosis primaria en cirugía urgente cuando el cirujano de guardia está especializado en cirugía colorrectal, con una incidencia de fallo anastomótico menor (6,2%) respecto a un cirujano no especializado (12,1%).<sup>60, 61</sup> La cirugía nocturna también ha sido descrita como factor de riesgo en la aparición de fugas anastomóticas, ya que en situaciones de falta de sueño disminuyen las habilidades técnicas del cirujano y la capacidad de resolver posibles problemas, con el aumento de la probabilidad de cometer errores.<sup>38</sup> Otros factores a tener en cuenta es que no existen diferencias respecto a los porcentajes de fuga anastomótica al comparar la cirugía abierta o laparoscópica<sup>62</sup>, las anastomosis mecánicas o manuales<sup>63</sup> y de forma menos sólida el empleo de drenajes intraperitoneales tampoco se asocia a un aumento del riesgo,<sup>64</sup> aunque existe literatura que arroja dudas sobre este hecho.<sup>65</sup>

### **1.3 La dehiscencia de sutura o fallo anastomótico**

Desde 1991 el “Grupo de Estudio de la Infección Quirúrgica” del Reino Unido (The United Kingdom Surgical Infection Study Group -SISG-) con intención de homogeneizar las múltiples definiciones de fallo o fuga anastomótica presentes en la literatura, define el término de fallo de una anastomosis como la ausencia de estanqueidad completa de la unión quirúrgica entre dos vísceras huecas. El contenido intestinal puede emerger a través de la herida o de un drenaje intraabdominal, o coleccionarse causando fiebre, absceso, sepsis, trastornos metabólicos y/o fallo multiorgánico. También se define el término de fuga subclínica como la salida del contenido desde la anastomosis hasta un área

vecina, detectada sólo mediante pruebas de imagen y en ausencia de signos y síntomas clínicos.<sup>66</sup> Dicha definición es un intento, como se ha dicho antes, de homogeneizar términos y definiciones que arrojasen algo de luz a las diversas y en ocasiones extremas estadísticas sobre fallo anastomótico presentadas en la literatura.

A pesar de esto, diez años después ya existía evidencia del fracaso de dicho intento de homogeneizar definiciones, ya que no existía una definición universalmente aceptada en la literatura, utilizando criterios dispares, signos y síntomas diferentes, así como pruebas de imagen distintas que no correlacionan sus resultados unos con otros.<sup>67</sup> Es por lo previo que se propone una nueva clasificación, en base a la del SISG, pero que incorpora los términos, signos y síntomas más utilizados en la literatura desde la publicación de la definición original, los mismos serían desde menor a mayor gravedad:<sup>67</sup>

- Fuga anastomótica “radiológica”: detectada únicamente en estudios radiológicos realizados de forma rutinaria, sin signos y síntomas clínicos y que no requiere cambio en el tratamiento.
- Fuga anastomótica “clínica menor”: debe ser confirmada radiológicamente y presentar descarga intestinal o purulenta a través de la herida o de los drenajes intraabdominales, acompañarse de fiebre ( $>38^{\circ}\text{C}$ ), leucocitosis ( $>10000/\text{l}$ ) o absceso. No requiere cambio en el tratamiento ni reintervención, pero prolonga la estancia hospitalaria.
- Fuga anastomótica “clínica mayor”: debe ser confirmada radiológicamente. Presenta los mismos signos y síntomas que la anterior pero el grado de las consecuencias clínicas requieren cambio en el tratamiento médico y/o reintervención.

En esta nueva clasificación se incluyen las fístulas anastomóticas detectadas dentro de los primeros 30 días postoperatorios, aunque existen

trabajos que demuestran la existencia de fugas anastomóticas más tardías, por lo que podría considerarse prudente alargar el tiempo de seguimiento.<sup>68</sup>

Se han propuesto otras clasificaciones, todas ellas similares en su concepto de priorizar el tipo de tratamiento que permite definir los grupos. Por ejemplo en el 2010 se propone una clasificación en función del grado de fallo anastomótico tras resección anterior de recto. Dividen las fugas anastomóticas en función de su impacto en el tratamiento en tres grupos<sup>69</sup>, dichos grupos pueden relacionarse de forma adecuada con la clasificación Dindo-Clavien de las complicaciones postoperatorias (tabla 2):<sup>70</sup>

A) Fuga anastomótica que no requiere intervención terapéutica activa. En este grupo entran aquellas complicaciones clasificadas como Dindo-Clavien grados I y II.

B) Fuga anastomótica que requiere intervención terapéutica activa sin relaparotomía. En este grupo entran aquellas complicaciones clasificadas con grado IIIa según Dindo-Clavien.

C) Fuga anastomótica que requiere relaparotomía. En este grupo entran aquellas complicaciones clasificadas como IIIb y IV según la clasificación de Dindo-Clavien.

TABLA 2

Clasificación Dindo-Clavien

Grade	Definition
Grade I	Any deviation from the normal postoperative course without the need for pharmacological treatment or surgical, endoscopic, and radiological interventions Allowed therapeutic regimens are: drugs as antiemetics, antipyretics, analgetics, diuretics, electrolytes, and physiotherapy. This grade also includes wound infections opened at the bedside
Grade II	Requiring pharmacological treatment with drugs other than such allowed for grade I complications Blood transfusions and total parenteral nutrition are also included
Grade III	Requiring surgical, endoscopic or radiological intervention
Grade IIIa	Intervention not under general anesthesia
Grade IIIb	Intervention under general anesthesia
Grade IV	Life-threatening complication (including CNS complications)* requiring IC/ICU management
Grade IVa	Single organ dysfunction (including dialysis)
Grade IVb	Multiorgan dysfunction
Grade V	Death of a patient
Suffix "d"	If the patient suffers from a complication at the time of discharge (see examples in Table 2), the suffix "d" (for "disability") is added to the respective grade of complication. This label indicates the need for a follow-up to fully evaluate the complication.

\*Brain hemorrhage, ischemic stroke, subarachnoidal bleeding, but excluding transient ischemic attacks.  
CNS, central nervous system; IC, intermediate care; ICU, intensive care unit.

Adaptado de: Dindo et al. Ann Surg 2004.

### **1.3.1 Incidencia del fallo anastomótico**

La mortalidad en los casos de fallo anastomótico puede alcanzar hasta un 5-22%.<sup>69</sup> Tras el fallo anastomótico se suele generar una situación de urgencia que habitualmente requiere reintervención o reintervenciones, puede ser necesario manejo postoperatorio en Unidades de Cuidados Intensivos, generalmente de forma prolongada y se alarga de forma considerable el ingreso hospitalario y con ello los gastos asociados al proceso.<sup>71, 72</sup> Incluso más trascendental es el hecho de que el fallo anastomótico produce un claro deterioro no solo en la calidad de vida de los pacientes, sino que afecta negativamente el pronóstico, aumentando en los casos de cáncer, la tasa de recidiva local, disminuyendo el periodo libre de enfermedad y finalmente disminuyendo de forma significativa la supervivencia global.<sup>21, 73, 74</sup>

Según la literatura reciente, la tasa de fallo o fuga anastomótica en la cirugía colorectal parece situarse en torno al 2-14%.<sup>75</sup> Dicha incidencia es incierta ya que, a pesar de los intentos de estandarización, se sigue utilizando criterios y definiciones diferentes, la mayoría de los trabajos son de naturaleza retrospectiva, y se tienden a agrupar pacientes y procedimientos diferentes como lo son la cirugía sobre el colon y sobre el recto.<sup>21</sup> Tampoco se suele diferenciar entre patologías de naturaleza distinta, como lo son el cáncer, enfermedad inflamatoria intestinal o la enfermedad diverticular.<sup>24</sup> También es conocido que en el caso de las anastomosis colorectales, el fallo anastomótico es mayor cuando menor es la distancia respecto al margen anal.<sup>39</sup>

### **1.3.2 Medidas preventivas ante el fallo anastomótico**

#### *1.3.2.1 Ostomia derivativa*

Muchos cirujanos recomiendan la realización de estomas de protección en pacientes con factores de riesgo de fallo anastomótico<sup>45, 46</sup>. Aunque se ha demostrado que la realización de dicho estoma de protección no disminuye la

incidencia de fuga anastomótica<sup>76</sup>, sí que resulta útil a la hora de limitar las consecuencias clínicas tras la aparición de la misma.<sup>77</sup> Habitualmente la mayoría de cirujanos prefiere la realización de una ileostomía exteriorizada por el flanco derecho, pero también está descrita y se realiza en algunos centros, la colostomía lateral, confeccionada de forma muy similar a la ileostomía sobre varilla. En línea con los factores de riesgo expuestos anteriormente, existe literatura que recomienda la realización de un estoma de protección en pacientes con cirugías de más de 200 minutos de duración, con pérdidas sanguíneas mayores a 2000 ml y con necesidad de transfusión intraoperatoria.<sup>78</sup>

#### *1.3.2.2 Ileostomía virtual*

Con el objetivo de evitar una nueva cirugía para la reconstrucción del tránsito en pacientes sometidos a resecciones bajas de recto y las posibles complicaciones derivadas del cierre de la ostomía, así como para mejorar la calidad de vida de los pacientes, existen grupos que han descrito la confección de ileostomías virtuales. En esta técnica, el asa de la ileostomía se deja referenciada en la pared abdominal y sólo se exterioriza, mediante anestesia local, en caso de que se demuestre clínica y/o endoscópicamente la fuga anastomótica. Mori y cols. publicaron su experiencia sobre 168 pacientes con resección anterior de recto y escisión mesorrectal total. En sus datos recogen una incidencia de fallo anastomótico de 20 pacientes sobre 168 (11,96%) y en 13 pacientes se pudo evitar una relaparotomía mediante la exteriorización de la ileostomía virtual con anestesia local, otros 5 pacientes se trataron de forma conservadora y los otros 2 requirieron relaparotomía urgente por peritonitis. Estos autores concluyeron que la ileostomía virtual debe reservarse para anastomosis que en principio presentan un riesgo relativamente bajo, por ejemplo las realizadas en ausencia de radio-quimioterapia preoperatoria, pero que las condiciones del paciente o la presentación de su enfermedad aconsejen actuar con mayor prudencia de la habitual.<sup>79</sup>



#### 1.3.2.3 Adhesivos o parches biológicos

Se comentarán de forma detallada en el siguiente apartado.

#### 1.3.2.4 Terapia con células madre

La investigación sobre células madres ha experimentado un notable crecimiento durante la última década. A la fecha, existen estudios que han demostrado que es posible regenerar exitosamente ciertos tipos de tejidos e influir en el proceso de cicatrización utilizando células madres mesenquimales derivadas de tejido graso humano.<sup>80</sup>

Con un planteamiento similar a la epiploplastia, se ha propuesto reforzar el proceso de cicatrización del lecho anastomótico utilizando suturas enriquecidas con células madres del propio individuo de experimentación, dicho proceso se ha demostrado validado, efectivo<sup>81</sup> y existen reportes de su uso en modelos experimentales utilizando mayoritariamente ratas, en un principio sin encontrar diferencias significativas entre los grupos<sup>82</sup>, pero con resultados prometedores en series más recientes con disminución significativa de la tasa de fuga anastomótica, aumento de la presión de rotura, y todo ello sin incrementar la aparición de adherencias o modificar el proceso inflamatorio de forma negativa.<sup>83</sup> Respecto al proceso inflamatorio, se ha observado un acortamiento de la fase aguda de la inflamación, pasando a la fase crónica de manera precoz, utilizando suturas enriquecidas con células madres en un modelo experimental animal de anastomosis traqueales<sup>84</sup>, que bien podría extrapolarse a las uniones intestinales. También se ha probado su aplicación en perforaciones gástricas en modelo animal (ratas), de forma local al vehiculizarlas con adhesivos de fibrina que se aplican sobre la sutura finalizada, comparándolo con la inyección local de una solución rica en células madres mesenquimales en el espesor de la pared gástrica suturada, con hallazgos en línea de lo previo, acortando la fase aguda de la inflamación y reduciendo la tasa de dehiscencia, particularmente cuando es aplicado como inyección.<sup>85</sup>

Por último, es interesante comentar la revisión realizada por Caziuc y cols., que analizaron en un meta-análisis los resultados de 3 estudios y encuentran que la aplicación de células madres tienen un efecto beneficioso respecto a la

presión de rotura de las anastomosis, influyendo además de forma favorable en la angiogénesis, existiendo según los autores potenciales beneficios en las anastomosis sometidas a isquemia, lo que ciertamente puede abrir un campo de investigación poco explorado hasta el momento.<sup>86</sup>

## **1.4 Adhesivos tisulares y biológicos**

Un adhesivo es una sustancia o material que aplicado sobre una superficie establece una resistencia a su separación debido a la existencia de fuerzas de atracción entre las moléculas del adhesivo y las de la superficie.<sup>87</sup> La idea de unir heridas, tejidos y anastomosis con pegamentos es bastante antigua en la historia de la cirugía, conllevando la búsqueda de un adhesivo quirúrgico seguro, de acción rápida, biológicamente compatible y con la resistencia adecuada. Existen en el mercado productos encaminados a favorecer la hemostasia, el sellado y/o la adhesividad entre diferentes tejidos, sustancias de las que disponen los cirujanos en distintos momentos de su actividad quirúrgica. Muchos de estos productos siguen siendo estudiados para constatar su utilidad. Los adhesivos tisulares son sustancias que polimerizan en contacto con los tejidos, deben ser capaces de mantener los tejidos en el lugar, durante el tiempo necesario, para facilitar los procesos de cicatrización natural de las áreas cortadas o separadas y una vez cumplida su función, lo ideal sería su desaparición, evitando la presencia de cuerpos extraños que entorpecieran la cicatrización u otros efectos adversos.<sup>88</sup>

De momento su uso de forma exclusiva no ha demostrado seguridad ni factibilidad en la práctica diaria de la cirugía digestiva<sup>89</sup>, pero ha generado una interesante línea de investigación respecto a los potenciales beneficios de reforzar anastomosis realizadas de forma habitual con dichos adhesivos. Actualmente existen varias sustancias que se utilizan como sellantes en cirugía: derivados del cianoacrilato, derivados de fibrina, derivados de albúmina-glutaraldehído y los derivados de polietilenglicol entre otros. Hasta la fecha, en

lo que respecta a las anastomosis, existe evidencia sólida de la reducción de fugas en el caso de las uniones vasculares<sup>90</sup>, pero no se dispone de evidencias suficientes en el caso de las anastomosis digestivas, dado que alguna literatura apoya su uso e incluso refiere una disminución en el número de fallo anastomótico con dicho refuerzo,<sup>91</sup> mientras que otros autores no encuentran diferencias o beneficio con los mismos.<sup>92</sup>

Los adhesivos tisulares pueden ser de origen sintético o de más reciente aparición biológicos y son utilizados con fines terapéuticos. Por eso deberían reunir una serie de condiciones que fueron definidas por Cumberland en 1950 y Sales en 1953:

- El material en cuestión no debe ser alterado físicamente por los tejidos.
- Debe ser químicamente inerte.
- Debe producir escasa o nula reacción a cuerpo extraño.
- No debe ser carcinogénico.
- No debe provocar reacciones de hipersensibilidad o alergia.
- Debe resistir la tracción mecánica adecuándose a los esfuerzos a los que es sometida la herida.
- Debe poder ser esterilizado sin perder sus propiedades.

En 1970 W. H. Heiss estableció las propiedades de un adhesivo tisular para uso quirúrgico:<sup>93</sup>

- Alto poder adherente.
- Polimerización rápida sin cambio de volumen en medio húmedo.
- Baja toxicidad y ausencia de irritación tisular.
- Acción rápida, en unos segundos.

- No poseer propiedades carcinogénicas.
- Reabsorción lenta tras el cierre de la herida.
- Esterilización eficiente sin variar sus propiedades.

Los sellantes de fibrina, en sus distintas modalidades comerciales, son agentes quirúrgicos hemostáticos y adhesivos derivados principalmente de productos de plasma humano. Su función es reproducir los pasos finales en la cascada de coagulación formando un coágulo de fibrina que evita la pérdida sanguínea, y ayuda en el proceso de cicatrización, siendo degradado naturalmente por las enzimas del cuerpo. De forma general los sellantes de fibrina ya han sido utilizados, por ejemplo, para:

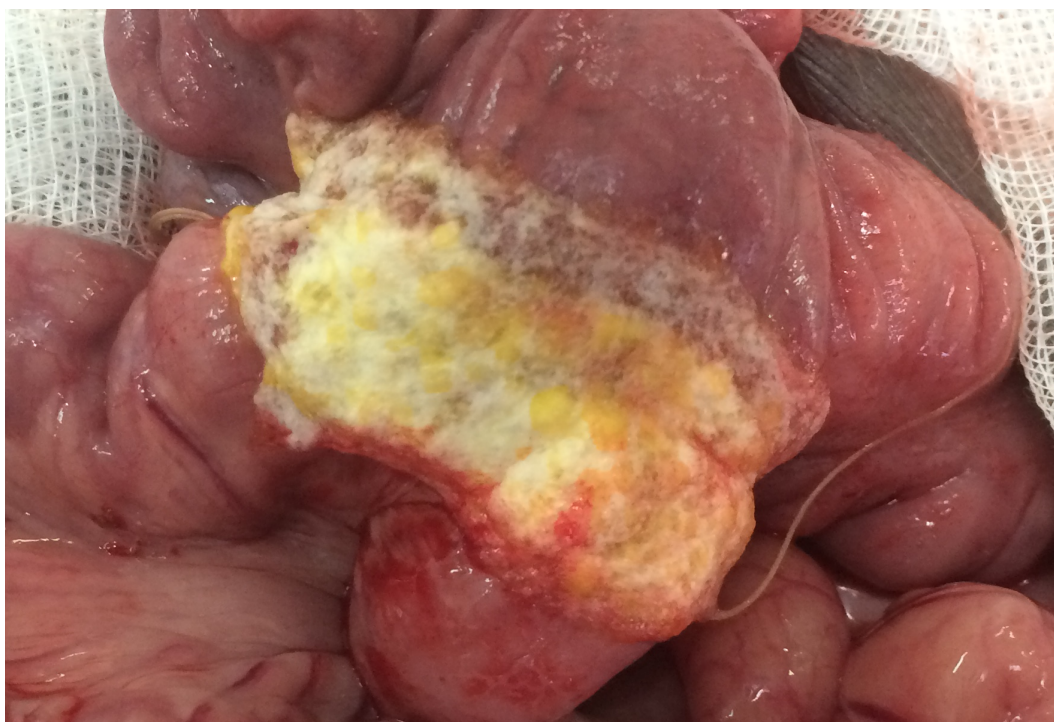
- Ayudar en el logro de la hemostasia en un campo hemorrágico, particularmente en aquellas situaciones con superficies de corte extensas o con predisposición al sangrado (hepáticas, pancreáticas o esplénicas).<sup>94</sup>
- Ayudar en el sellado de filtraciones de órganos huecos (resecciones pulmonares, fistulas traqueobronquiales).<sup>95</sup>
- Favorecer la hemostasia en pacientes con úlceras hemorrágicas.<sup>96</sup>
- Reducir la incidencia de infección o fistulas de líquido cefalorraquídeo en procedimientos neuroquirúrgicos.<sup>97</sup>

De esta forma, estos sellantes son usados en una amplia gama de procedimientos quirúrgicos permitiendo reducir las complicaciones asociadas a la cirugía, el tiempo de intervención y sirviendo de soporte para cualquier tipo de sutura. Su eficacia y seguridad ha sido evaluada por diferentes estudios según se desprende en los Informes Europeos Públicos de Evaluación (European public assessment report -EPAR-) de la Agencia Europea de Medicamentos (European Medicines Agency -EMA-)<sup>98</sup> y su uso clínico está plenamente aceptado en humanos. No obstante, aunque no tienen indicación restringida para

ningún tipo de cirugía, no se ha demostrado claramente que el uso de la fibrina tenga un papel beneficioso en las anastomosis intestinales.<sup>97</sup> Por las características propias de estos materiales, parece lógico pensar que los sellantes de fibrina pueden ser útiles en el refuerzo, o incluso puedan llegar a remplazar a las suturas, en los procedimientos quirúrgicos.

#### **1.4.1 Tachosil®**

Se trata de un agente hemostático y sellador presentado en forma de esponja. Tachosil® contiene fibrinógeno y trombina humanos en forma de capa seca en la superficie de una matriz de colágeno equino. En contacto con los líquidos fisiológicos (por ejemplo, sangre, linfa o una solución salina fisiológica), los componentes de dicha capa se disuelven y se esparcen parcialmente por la superficie de la herida. A continuación, se produce una reacción del fibrinógeno y la trombina que inicia la última fase de la coagulación fisiológica de la sangre. El fibrinógeno se convierte en monómeros de fibrina que se polimerizan de manera espontánea para formar un coágulo de fibrina, que mantiene la matriz



**Figura 9: Anastomosis recubierta por parche de fibrina Tachosil®.**

de colágeno fuertemente adherida a la superficie de la herida. La fibrina queda unida en enlaces cruzados por el factor endógeno XIII, creándose una red firme y mecánicamente estable con buenas propiedades adhesivas, por lo que al mismo tiempo sirve como sellante (figura 9).<sup>98</sup>

En estudios con animales, Tachosil® se degrada después de la administración en la superficie de la herida quedando pocos restos después de 13 semanas. Se observó degradación completa de Tachosil® en algunos animales 12 meses después de su administración sobre una herida en hígado, mientras que en otros se observaron aún pequeños restos. La degradación se asoció con la infiltración de granulocitos y la formación de tejido de granulación reabsorbible que encapsulaba los restos de la degradación progresiva de Tachosil®. En los estudios con animales no se han observado evidencias de intolerancia local.<sup>98</sup>

## **1.5 Aspectos moleculares de la respuesta a la hipoxia y la inflamación en relación con la cicatrización**

A continuación se analizan brevemente algunos aspectos moleculares vinculados con la respuesta a la hipoxia y la inflamación, que guardan relación con la cicatrización y que son objeto de esta tesis doctoral.

### **1.5.1 Factor Inducible por hipoxia (HIF)**

Los dos factores inducibles por la hipoxia, HIF-1 y HIF-2, son los principales mediadores de la adaptación celular a la hipoxia y se hallan fuertemente expresados, en condiciones de hipoxia tanto regional como sistémica. El factor HIF-1 inducido por la hipoxia (Hypoxia Inducible Factor) es un complejo proteico que incrementa la expresión de genes específicos en presencia de bajas concentraciones de oxígeno. El HIF ha sido identificado con ocasión de estudios de la regulación del gen que codifica a la eritropoyetina (EPO), pero se observó

rápidamente que desempeñaba funciones bastante más importantes en materia de adaptación entre aportes y requerimientos de oxígeno.<sup>99</sup>

La respuesta hipóxica, sobre la que se dispone de nuevos datos críticamente importantes, puede esquematizarse en tres sistemas: de detección o sensor de oxígeno; de regulación, que controla la expresión génica; y efector. El elemento principal de organización del sistema regulador es un factor de transcripción específico, el factor inducible por hipoxia 1 (HIF-1). En presencia de oxígeno, la subunidad  $\alpha$  del HIF-1 (HIF-1 $\alpha$ ) se modifica por las hidroxilasas, que constituyen el punto central del mecanismo sensor, induciendo su catabolismo por el proteosoma. Por el contrario, en hipoxia, o en presencia de algunos factores de crecimiento que incrementan su síntesis, el HIF-1 $\alpha$  se transloca al núcleo, donde, unido al HIF-1 $\beta$ , actúa como factor transcripcional de genes con elementos de respuesta hipóxica (HRE) en su promotor. Estos regulan la síntesis de una amplia serie de proteínas, que abarcan desde enzimas respiratorias y transportadores hasta hormonas involucradas en la regulación a escala del organismo de la circulación y la eritropoyesis. El papel del HIF-1 no se restringe a la mera inducción de una respuesta adaptativa a la falta de oxígeno, sino que participa significativamente en los mecanismos de reparación celular. Una simple lista de algunas alteraciones de importancia fisiopatológica, tanto estimuladoras como inhibitorias, que involucran al sistema de HIF-1, incluiría: enfermedad pulmonar crónica, adaptación al tabaco/humo, anemia/hemorragia, isquemia/reperfusión, crecimiento, vascularización y resistencia celular de los tumores, preeclampsia y crecimiento intrauterino retardado, hiper o hipovascularización retiniana, sobredosis de fármacos, enfermedad inflamatoria intestinal y curación de heridas. Esta sola enumeración ilustra la importancia de este mecanismo.<sup>100</sup>

La sobreexpresión de HIF-1 protege el epitelio colónico ante la inflamación, mientras que la ausencia de HIF-1 produce el efecto contrario.<sup>101</sup> En heridas el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) aumenta localmente durante la curación de heridas, involucrando un mecanismo mediado por los reactivos de oxígeno (ROS).<sup>57, 102</sup> En este contexto, la sobreactivación de la vía de HIF-1 puede ser útil para incrementar la vascularización, permeabilidad vascular y cicatrización en heridas donde el VEGF no haya aumentado suficientemente.<sup>100</sup>

### **1.5.2 Factor nuclear kappa B**

El factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) desempeña una función central en la inflamación y promueve la expresión de genes implicados en algunos aspectos del cáncer como supervivencia, proliferación y control del ciclo celular, angiogénesis e invasividad.<sup>103</sup>

En prácticamente todos los organismos en los que ha sido caracterizado, NF- $\kappa$ B participa principalmente en la modulación de la respuesta inmune a distintos niveles. En mamíferos tiene participación importante en la inflamación, la respuesta a estrés, la diferenciación y activación de células inmunes. La variedad de señales que pueden activar NF- $\kappa$ B es reflejo de la cantidad de eventos con los que ha sido relacionado. Los que han sido mejor caracterizados son aquellos que involucran citocinas inflamatorias como Interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), los relacionados con agentes infecciosos como lipopolisacárido bacteriano y expresión de antígenos virales.<sup>104</sup> Se ha descrito que también puede ser activado por eventos relacionados con daño celular, como radiación ultravioleta o estrés oxidativo<sup>105</sup>, exposición a metales<sup>106</sup> y fenómenos particulares, como el aumento de los niveles citoplásmicos de calcio. La activación de NF- $\kappa$ B es sensible en muchos casos al estado redox o a la sobreexpresión de enzimas antioxidantes, por lo cual puede ser regulado por el estado de oxidorreducción general de la célula.<sup>104</sup>

## **1.6 El cerdo como modelo experimental**

En general el modelo porcino ha sido establecido como la mejor opción para ensayos preclínicos en humanos, ya que genética y fisiológicamente son muy similares.<sup>107, 108</sup> Por su similitud anatómica y fisiológica, esta especie ya se ha caracterizado ampliamente en estudios renales, cardiovasculares y gastrointestinales. Además, el aparataje y las técnicas utilizadas son comparables a las de los hospitales, y los sistemas de monitorización y los



procedimientos quirúrgicos son mucho más sencillos de llevar a cabo que en especies de menor tamaño, como la rata o el ratón.

## **JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO**

## 2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

A lo largo de la Historia de la Medicina se han conseguido grandes revoluciones que han permitido el desarrollo de la Cirugía hasta la era moderna. La primera revolución se produjo en el siglo XIX por el descubrimiento de la “Anestesia y el Control del Dolor”, que permitió el desarrollo de las primeras técnicas quirúrgicas invasivas. Sin embargo, el Siglo XX es considerado el Siglo de Oro de la Cirugía. En él se consigue la revolución de la “Hemostasia y el Control de la Hemorragia” permitiendo a los cirujanos realizar cirugías cada vez más complejas minimizando los riesgos para el paciente. También se consigue control sobre el sistema inmune de los pacientes permitiendo el desarrollo y la expansión de la Cirugía de los Trasplantes de Órganos. Sin embargo, en el Siglo XXI todavía está pendiente por conseguir la “Revolución sobre las Suturas y su Cicatrización”. A pesar de los formidables avances de los que disponemos en la actualidad en Cirugía, el proceso de cicatrización continúa siendo una variable fundamentalmente paciente-dependiente en la que los cirujanos no sabemos ni podemos por el momento influir.

La anastomosis intestinal supone uno de los principales gestos en cualquier cirugía digestiva. A pesar de que el cirujano siga cuidadosamente los principios básicos de confección de una anastomosis intestinal y de que disponga de dispositivos cada vez más sofisticados para realizar la sutura la dehiscencia de sutura en cirugía colorrectal está próxima al 8-10% en nuestro medio.<sup>109</sup> Este porcentaje se incrementa exponencialmente en los casos de anastomosis rectales bajas, anastomosis en condiciones críticas o realizadas en cirugías urgentes. La dehiscencia de sutura es por tanto, una fuente de problemas trascendentales en la evolución de nuestros pacientes condicionando un aumento de la morbilidad postquirúrgica y afectando de manera negativa a la supervivencia global.<sup>110, 111</sup>

El empleo de SF en sus diferentes presentaciones está ampliamente aceptado en múltiples especialidades quirúrgicas para control de la hemostasia por su capacidad hemostática. Su eficacia y seguridad de empleo fue evaluada

en el informe EPAR-EMEA siendo aceptadas para su uso clínico en humanos.<sup>98</sup> Pero además, parece lógico pensar que los SF pudieran tener cierto papel en la cicatrización de las suturas además de por su capacidad hemostática por su capacidad sellante. Otras propiedades de los SF como la facilidad de colocación a modo de refuerzo de la anastomosis junto con su capacidad biodegradable hacen que se hayan investigado nuevas indicaciones de empleo. Sin embargo, la literatura médica en el empleo de SF en forma de parche (fundamentalmente Tachosil®) de fibrina para proteger anastomosis intestinales es escasa hasta el momento. Los estudios publicados muestran resultados contradictorios en cuanto a el papel protector del parche de fibrina en la dehiscencia y están realizados en modelos experimentales en suturas en intestino de rata no equiparable al intestino humano.<sup>91, 95</sup> Además, el papel del parche en la prevención de dehiscencias se debería obtener sobre un modelo que tuviera una tasa alta de dehiscencias de sutura que no es posible obtener por razones obvias en estudios con humanos.<sup>112</sup>

Es por esto por lo que se diseña el presente proyecto de investigación con las siguientes fases para evaluar el papel de la colocación del parche de fibrina en la dehiscencia de anastomosis; La primera fase consiste en diseñar un modelo de dehiscencia de anastomosis fiable y fácilmente reproducible, mediante la confección de una sutura íleo-cólica en condiciones de hipovascularización-isquemia esperando observar un alto porcentaje de dehiscencias. Para este modelo se elige el cerdo por su similitud anatómica y fisiológica con el intestino humano y la posibilidad de realizar una isquemia selectiva de la arteria marginal del intestino antes de confeccionar la anastomosis. La segunda parte del proyecto consiste en evaluar el papel de la colocación del parche de fibrina a modo de refuerzo sobre la anastomosis potencialmente dehiscente. Por último, se pretende evaluar la influencia del parche en los mecanismos de cicatrización locales de la anastomosis y su posible papel en la regeneración tisular.

## **HIPOTESIS**

### **3. HIPÓTESIS**

#### **3. Hipótesis del estudio**

El empleo de parches sellantes formadores de fibrina en matriz de colágeno, como refuerzo de anastomosis ileocólicas en un modelo experimental de isquemia en intestino del cerdo, disminuye el porcentaje y severidad de las complicaciones derivadas de la dehiscencia de anastomosis.

## **OBJETIVOS**

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo principal:**

Evaluar el efecto causado por la presencia de un parche sellante, formado por una matriz de colágeno que contiene fibrinógeno y trombina, a modo de refuerzo en modo aleatorizado sobre anastomosis realizadas en intestino isquémico. Se valorarán de forma prospectiva los hallazgos en los dos grupos del estudio; Grupo Casos (anastomosis reforzadas con parche) vs. Grupo Controles (anastomosis sin parche) desde dos puntos de investigación: 1) macroscópico-clínico, estudiando el porcentaje de dehiscencia macroscópica postoperatoria y el grado de severidad de las adherencias postquirúrgicas en ambos grupos y 2) microscópico-inmunohistoquímico, mediante la evaluación de los especímenes quirúrgicos de ambos grupos e inmunohistoquímico, estudiando el efecto de la colocación del parche sobre la expresión de marcadores específicos de isquemia (HIF-1 $\alpha$ ) y respuesta inflamatoria/reparativa ante la misma (NF- $\kappa$ B-p65).

### **4.2 Objetivos secundarios**

- Diseñar y validar un modelo experimental animal de anastomosis ileocólicas de alto riesgo por isquemia factible, reproducible y que replique condiciones semejantes a las anastomosis en humanos.
- Evaluar los posibles efectos negativos derivados de la colocación del parche de fibrina sobre la anastomosis; índice de severidad de



adherencias postoperatorias, presencia de formación de abscesos perianastomóticos y signos de estenosis de anastomosis.

- Evaluar el papel de la colocación del parche sobre el proceso de cicatrización de la anastomosis mediante el estudio de expresión inmunohistoquímica de marcadores de isquemia-reperfusión.

**MATERIALES Y METODOS**

**COMPENDIO DE PUBLICACIONES**

## **5. MATERIALES Y METODOS**

### **COMPENDIO DE PUBLICACIONES**

#### **5.1 Primera publicación:**

TITULO: Development of an ischemic experimental model for testing suture failure on intestinal anastomosis

AUTORES: Carlos Garcia-Vasquez, María Fernández-Aceñero, David De-Pablo, María García Gómez de las Heras, Patricia Tejedor, Carlos Pastor.

REVISTA: International Journal of Current Advanced Research (IJCAR).

FI (SJIF) 2017: 6,614

#### **RESUMEN DEL ESTUDIO**

Las anastomosis críticas son aquellas realizadas en condiciones locales desfavorables que en ocasiones escapan del control del cirujano, como pueden ser situaciones de urgencia, shock hipovolémico, o situaciones de déficit de vascularización en un determinado segmento intestinal tras la extirpación de un tumor. En este escenario pretendemos diseñar un modelo experimental sencillo y fácilmente reproducible de dehiscencia de anastomosis ileocólica producida tras ligadura selectiva de la arteria marginal.

En este estudio presentamos los resultados de nuestro modelo experimental en cerdos de anastomosis ileocólica crítica. El modelo se diseña mediante una ligadura selectiva de la arteria marginal del ciego en una extensión de 10 cm. en la pared intestinal antes de confeccionar la anastomosis sobre el centro del segmento afecto. Con el objetivo de validar el modelo se realiza un estudio piloto en 10 cerdos de la raza "Large White" intervenidos según el protocolo del estudio realizando una segunda laparotomía exploradora al 5º día

postoperatorio. Se obtiene un modelo fácilmente reproducible, con una tasa de dehiscencia anastomótica macroscópica del 30%.



## A NEW PORCINE MODEL FOR THE STUDY OF HIGH-RISK COLONIC ANASTOMOSES DUE TO HYPOPERFUSION

Carlos Garcia-Vasquez<sup>1</sup>, Maria Fernandez-Aceñero<sup>2</sup>, David De-Pablo<sup>2</sup>, Maria Garcia Gomez de las Heras<sup>3</sup>, Patricia Tejedor<sup>4</sup> and Carlos Pastor<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Surgery, Hospital Universitario Infanta Elena (Av. de los Reyes Catolicos, 21, 28342 Valdemoro, Madrid)

<sup>2</sup>Surgical Pathology, Hospital Clínico San Carlos. (Calle de Isaac Peral, 58, 28040 Madrid)

<sup>3</sup>Histology, Universidad Rey Juan Carlos (Calle Tulipán, s/n, 28933 Móstoles, Madrid)

<sup>4</sup>Surgery, Fundación Jiménez Díaz (Av. Reyes Católicos, 2, 28040 Madrid)

### ARTICLE INFO

#### Article History:

Received 5<sup>th</sup> April, 2018

Received in revised form 24<sup>th</sup>

May, 2018 Accepted 20<sup>th</sup> June, 2018

Published online 28<sup>th</sup> July, 2018

#### Key words:

Anastomosis, ischemia, intestine, leakage, failure, animal model

### ABSTRACT

Gastrointestinal anastomosis is a common procedure, leakage brings a significant increase in mortality and morbidity (Kofoed SC *et al.*, 2014). Multiple animals models have being proposed for the study of the anastomosis leakage, the pig is one of the most appropriate. We present a new model of high-risk colo-ileal anastomosis, conditioned by hypoperfusion of the cecum. After 5 days the anastomosis were recovered. A 30% rate of anastomosis failure was found. We think that our model is effective for the study of ischemia effects on intestinal anastomosis and may be a way of reducing the number of subjects needed on studies. **Introduction:** The suture failure in intestinal surgery known as anastomotic leakage is a serious complication resulting in a significant increase of postoperative complications and mortality. The incidence of anastomotic leakage depends on several conditions such the quality of the surgical technique, the patient's conditions and whether if the suture in made involving the colon or the rectum with fecal contamination.

**Methods:** We present a novel experimental model of anastomotic leakage on pigs by performing a high-risk ileocolic suture on pigs. With the aim to create an ischemic condition by a selective ligation of the marginal vessels of a 5-10 cm. segment of colon at the cecum level. Afterwards, we performed a standardized hand-sewn anastomosis between the ileum and the hypovascularized colon. On the 5<sup>th</sup> postoperative day the animals were euthanized and the anastomosis were reviewed by the same surgeons. We designed the experimental model expecting a 10% incidence of anastomotic leakage.

**Results:** Ten cases were included in this observational prospective study. At the second surgery we observed a 30% rate of clinically significant anastomosis leakage.

**Conclusions:** With the present experimental model we have validated a simple and feasible novel model in colonic surgeries for testing anastomotic failures.

Copyright©2018 Carlos Garcia-Vasquez *et al.* This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

### INTRODUCTION

The needed for an intestinal suture-anastomosis is one of the most common surgical procedures in colonic surgery (Ptok H *et al.*, 2007). The suture failure known as anastomotic leakage is a serious complication resulting in a significant increase of postoperative complications and mortality (Branagan G *et al.*, 2005; Buchs NC *et al.*, 2008; Kube R *et al.*, 2010; Marra F *et al.* 2009). It may present as generalized peritonitis, as a more localized abscess or as subclinical leakage that may only be recognized radiologically (Eberhardt JM *et al.*, 2009; Nordentoft T *et al.*, 2015). In addition, the presence of a leakage has a negative impact on survival after surgery (Law WL *et al.*, 2007; Walker KG *et al.*, 2004).

The incidence of anastomotic leakage depends on several conditions such the quality of the surgical technique, the patient's conditions and whether if the suture is made involving the colon or the rectum with fecal contamination (Thornton M *et al.*, 2011). Due to obvious ethical issues, the study of the anastomotic failure on human has some limitations as there is a relative low rate of failure's incidence on standard clinical practice that force to have big numbers of subjects to obtain statistical results.

On this context, the experimental studies on animals will eliminate some of the ethical limitations, but without additional gestures to promote the failure, the rate of incidence is, like on humans, still low (McArdle CS *et al.*, 2005). This situation promotes the research on novel experimental models on animals to test the anastomotic failure (Pommergaard HC *et al.*, 2011; Rutegard M *et al.*, 2012).

\*Corresponding author: Carlos Garcia-Vasquez

Surgery, Hospital Universitario Infanta Elena (Av. de los Reyes Catolicos, 21, 28342 Valdemoro, Madrid)

The aim of this study is to present an experimental model of intestinal anastomosis on pigs with a high possibility of developing anastomotic leakage. This model based on a selective ligation of the vessels of the cecum to create ischemia mimics the situation of performing a high-risk suture on patients with intestinal diseases.

## MATERIAL AND METHODS

A prospective, randomized experimental study was carried on in male "Large White" pigs, making a standard latero-lateral, ileo-cecal anastomosis, bypassing the ileocecal valve, with the same technique that in our regular practice on humans except for a previous devascularisation of the cecum area with a vascular ligature.

We performed the procedure on 10 male "Large White" pigs between 25 and 35Kg. All procedures were performed under general anaesthesia using Ketamine□, Fentanyl□ and Sevoflurane□. A prophylactic dose of Cefotaxime□2g was administrated during the anaesthesia induction, afterwards, the standard antiseptic measures and surgical drapes were placed. Then, a median laparotomy and a peritoneal cavity exploration were performed identifying the terminal ileum and the cecum. The next step was to perform a devascularisation of the last 10-15 cm. of the cecum area with a vascular ligature on the marginal artery (Fig. 1a). We performed an anastomosis on the same way that in our regular practice; sutures were done between the middle third of the caecum devascularized zone on one side and the terminal ileum on the other side, in a latero-lateral fashion (Fig. 1b), with a 2cm opening, using a monoplane resorbable monofilament continuous suture (3/0 Biosyn, Covidien□). Finally, the laparotomy was closed with a continuous suture on the fascia and skin staples.

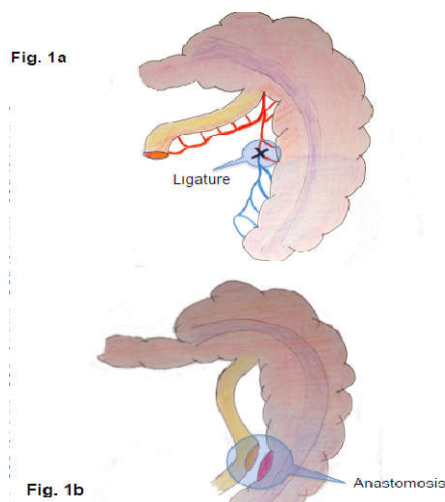


Figure 1 Colonic devascularisation (a) and anastomotic conformation (b).

On All animals were stabled in our experimental institute, on supervised and climate controlled cubicles, restarting oral intake on the first postoperative day, with free access to water and standard commercial fodder mixed with 600mg of Ibuprofen□ every 12 hours. Basal temperature and a physical exploration were performed to assure the welfare and clinical evolution of the animals.

On 5th postoperative day all subjects were sacrificed, then revised, first exploring the abdominal cavity searching for adhesions, signs of peritonitis, abscess or faecal contamination, classifying those findings, and then resecting the anastomoses including at least the last 10cm on each intestinal stump.

Then we proceed to euthanatize the subjects with an overdose of the anaesthetics agents. All specimens were sent to the Pathology department and a microscopic analysis of the anastomosis was performed for assessing microabscess, microscopic leakage, neovascularization and cellularity. We designed the experimental model expecting a 10% incidence of anastomotic leakages.

## RESULTS

All 10 procedures were performed without complications, and during the stabled time all animals had a normal behaviour, admitting the diet and medication normally, and even having regular bowel movements on all the subjects.

From a macroscopic point of view, 3 animals had a macroscopic leakage, with local abscess and faecal contamination as the major findings, without distant or diffuse peritonitis. The most frequent adhesion indexes were 1 and 3 (Table 1), with apparent not statistical significant relation to the anastomotic leakage, probably because of the small size sample.

The microscopic study showed a polymorphonuclear dominance (median of 83,5%), 6 cases had important neovascularization, without relation with the presence of leakage. All the samples had signs of necrosis, with no difference on frequency between the focal or disseminate form.

Table 1

ID	Leak	PMN	Lymp	Vessels	Fibroblast	Macrophages	Necrosis	Haemorrhage
1	No	80%	10%	Neoformed	++	10%	Focal	Diffuse
2	No	95%	5%	Mature	+++	< 2%	Extensive	Focal
3	No	95%	5%	Mature	++	< 2%	Extensive	Focal
4	No	65%	35%	Neoformed	++	< 2%	Focal	Diffuse
5	No	95%	5%	Neoformed	++	< 2%	Focal	Diffuse
6	Si	90%	10%	Neoformed	++	< 2%	Focal	Diffuse
7	Si	70%	30%	Mature	+++	< 2%	Extensive	Limited
8	No	85%	15%	Mature	+++	<2%	Extensive	Limited
9	No	75%	25%	Neoformed	++	5%	Focal	Limited
10	Si	85%	15%	Neoformed	++	< 2%	Extensive	Diffuse

## CONCLUSIONS

Our experimental study is a simple, feasible and non-expensive model for the study of anastomotic leakages in colonic surgeries. The model mimicked routine clinical situations on humans with an observed rate of 30% of leakages, and it could help in the reductions of animal subjects needed, investigation of new treatments to prevent anastomotic failure and in the costs reduction of further clinical studies.

## Acknowledgments

This study is in accordance with the European Animal Experiment Legislation, controlled by the Madrid Community experimental animals welfare office and has been registered with number 10/129734.9/14. The study has also been reviewed and approved by the Ethical Review Board of our institution.

All persons who meet authorship criteria are listed as authors, and all authors certify that they have participated sufficiently in the work to take public responsibility for the content. The authors declare no conflict of interest. Funds were provided by Takeda Pharmaceutical, however, we do not have any contractual relation with the company and had complete liberty on the study design and elaboration.

We do not have any other relationships or activities that could appear to have influenced the submitted work.

## References

- Branagan G, Finnis D: Prognosis after anastomotic leakage in colorectal surgery. *Dis Colon Rectum* 2005;48:1021-1026.
- Buchs NC, Gervaz P, Secic M, Bucher P, Mugnier-Konrad B, Morel P: Incidence, consequences, and risk factors for anastomotic dehiscence after colorectal surgery: a prospective monocentric study. *Int J Colorectal Dis* 2008;23:265-270.
- Eberhardt JM, Kiran RP, Lavery IC: The impact of anastomotic leak and intra-abdominal abscess on cancer-related outcomes after resection for colorectal cancer: a case control study. *Dis Colon Rectum* 2009;52:380-386.
- Kofoed SC, Calatayud D, Jensen LS, Jensen MV, Svendsen LB: Intrathoracic anastomotic leakage after gastroesophageal cancer resection is associated with reduced long-term survival. *World J Surg* 2014;38:114-119.
- Kube R, Mroczkowski P, Granowski D, Benedix F, Sahn M, Schmidt U, Gastinger I, Lippert H: Anastomotic leakage after colon cancer surgery: a predictor of significant morbidity and hospital mortality, and diminished tumour-free survival. *Eur J Surg Oncol* 2010;36:120-124.
- Law WL, Choi HK, Lee YM, Ho JW, Seto CL: Anastomotic leakage is associated with poor long-term outcome in patients after curative colorectal resection for malignancy. *J Gastrointest Surg* 2007;11:8-15.
- Marra F, Steffen T, Kalak N, Warschkow R, Tarantino I, Lange J, Zund M: Anastomotic leakage as a risk factor for the long-term outcome after curative resection of colon cancer. *Eur J Surg Oncol* 2009;35:1060-1064.
- McArdle CS, McMillan DC, Hole DJ: Impact of anastomotic leakage on long-term survival of patients undergoing curative resection for colorectal cancer. *Br J Surg* 2005;92:1150-1154.
- Nordentoft T, Pommergaard H-C, Rosenberg J, Bachiam M.P: Fibrin Glue Does Not Improve Healing of Gastrointestinal Anastomoses: A Systematic Review. *Eur Surg Res* 2015;54:1-13.
- Pommergaard HC, Rosenberg J, Schumacher-Petersen C, Achiam MP: Choosing the best animal species to mimic clinical colon anastomotic leakage in humans: a qualitative systematic review. *Eur Surg Res* 2011;47(3):173-81.
- Ptok H, Marusch F, Meyer F, Schubert D, Gastinger I, Lippert H: Impact of anastomotic leakage on oncological outcome after rectal cancer resection. *Br J Surg* 2007;94:1548-1554.
- Rutegard M, Lagergren P, Rouvelas I, Lagergren J: Intrathoracic anastomotic leakage and mortality after esophageal cancer resection: a population-based study. *Ann Surg Oncol* 2012;19:99-103.
- Thornton M, Joshi H, Vimalachandran C, Heath R, Carter P, Gur U, Rooney P: Management and outcome of colorectal anastomotic leaks. *Int J Colorectal Dis* 2011;26:313-320.
- Walker KG, Bell SW, Rickard MJ, Mehanna D, Dent OF, Chapuis PH, Bokey EL: Anastomotic leakage is predictive of diminished survival after potentially curative resection for colorectal cancer. *Ann Surg* 2004;240:255-259.

### How to cite this article:

Carlos Garcia-Vasquez *et al* (2018) 'A New Porcine Model for the Study of High-Risk Colonic Anastomoses Due to Hypoperfusion', *International Journal of Current Advanced Research*, 07(7), pp. 14106-14108.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.24327/ijcar.2018.14108.2546>

\*\*\*\*\*

## 5.2 Segunda publicación:

TITULO: Histopathological changes associated to an absorbable fibrin patch (Tachosil®) covering in an experimental model of high-risk colonic anastomoses.

AUTORES: García-Vásquez C, Gómez García de las Heras M, Pastor Idoate C, De Pablo D, Fernández-Aceñero MJ.

REVISTA: HISTOLOGY AND HISTOPATHOLOGY. From Cell Biology to Tissue Engineering.

FI: 2,025. Q1: Medicina Patológica y Forense (Scopus 2016). Q2: Histología (SJR 2017)

### RESUMEN DEL ESTUDIO:

En esta segunda publicación, utilizando el modelo desarrollado previamente se evalúa el efecto de la aplicación de un parche de fibrina en base colágeno (Tachosil®) a modo de refuerzo en las anastomosis isquémicas. Para ello, se diseñan dos grupos de estudio, un Grupo Casos con refuerzo de la anastomosis versus un Grupo Control sin refuerzo alguno de la sutura. La colocación del parche se decide de forma aleatorizada antes de comenzar la intervención quirúrgica, colocándose de forma homogénea según protocolo envolviendo por completo la anastomosis. Al 5º día postoperatorio se realiza una relaparotomía para evaluación macroscópica del grado de adherencias intraabdominales y del estado de la anastomosis. La anastomosis es resecada en bloque y remitida para estudio microscópico por parte de un patólogo para su evaluación de forma ciega.



Los resultados mostraron una disminución significativa de la tasa de fuga anastomótica desde un 57% en el grupo control hasta un 13% en el grupo estudio. También encontramos un aumento significativo de la presencia de abscesos en el grupo de estudio (78,5% vs 28,5%). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el resto de variables.

would be to provide a support mechanism for intestinal sutures with the objective to reduce the possibilities of leakage especially in high-risk anastomosis.

The aim of the present study is to determine whether the use of an absorbable fibrin sealant patch with the goal to protect the anastomosis would have an effect on preventing leakages. For this reason, we designed a reproducible experimental model of delayed leakages by performing intestinal sutures with hypovascularized tissues. In addition, a secondary objective is to analyze the histopathological tissue changes associated with the patch placement.

## Material and methods

### Phase I. Validation of an ischemic model

We performed a preliminary study on 10 male, “Large White” pigs between 27 and 32Kg with normal anatomy to assess the feasibility of our experimental model. Following premedication with Midazolam, the animals were induced to general anesthesia using weight-adjusted dosing of Ketamine, Fentanyl and Sevoflurane. A prophylactic dose of Cefotaxime 2g was administrated in each case at 30 minutes prior to skin incision. By medial laparotomy an initial exploration of the abdominal cavity was performed. The terminal ileum and caecum were identified and exposed. The next step was to perform a devascularization of the last 15cm of the caecum with a vascular ligature along the marginal artery and its small branches (Fig. 1A). Then, the surgeons performed a hand-sewn ileo-colic anastomosis done the same way as in regular practice. The anastomoses were done between the middle third of the caecum devascularized zone on one side and the terminal ileum on the other side, in a latero-lateral fashion (Fig. 1B), with a 2cm opening, using an absorbable suture (3/0 Biosyn, Covidien®) being careful to not leave tension between the ends of the anastomoses (Fig. 2).

All animals were kept in our experimental institute, supervised and in climate-controlled cubicles. Oral intake was resumed 24 hours postoperatively, with free access to water and standard commercial fodder mixed with 600mg of Ibuprofen every 12 hours. Basal temperature and physical exploration was performed daily to assure the welfare and clinical evolution of the animals. On the 5<sup>th</sup> postoperative day all subjects were sacrificed. A reoperation was then performed by exploring the abdominal cavity searching for adhesions, signs of peritonitis, abscess or fecal contamination. Afterwards an entire resection in bloc of the anastomosis was performed. To assess the grade of adhesions, we used a modification of Kamil’s visual scale ranging from 0 to 3 (0 no adhesions, 1 loose adhesions, 2 peri-anastomotic firm adhesions, 3 anastomotic to abdominal wall adhesions) (Kamil et al., 2014).

All specimens were sent to the pathology department and a microscopic analysis of the anastomosis was

performed, reporting any signs of microabscess, microscopic leakage, neovascularization and cellularity.

### Phase II. FS covering vs. non covering method

After the preliminary study, a second prospective randomized phase was performed. A new set of animals underwent surgery using the previously validated model.

Following the formation of ischemic anastomosis, cases were randomized by a computer into two groups: The covered group (CG) in which the entire anastomotic line was overwrapped with a collagen patch coated with fibrin glue components (Tachosil®) versus the non-covered group (NCG) in which the anastomoses were left untouched. After surgery, pigs were continuously monitored for a period of 5 postoperative days and euthanized on completion of the observation period.

### Surgical technique

After performing a surgical approach as described before and following the formation of the anastomoses, cases were randomized to the CG or NCG. In the

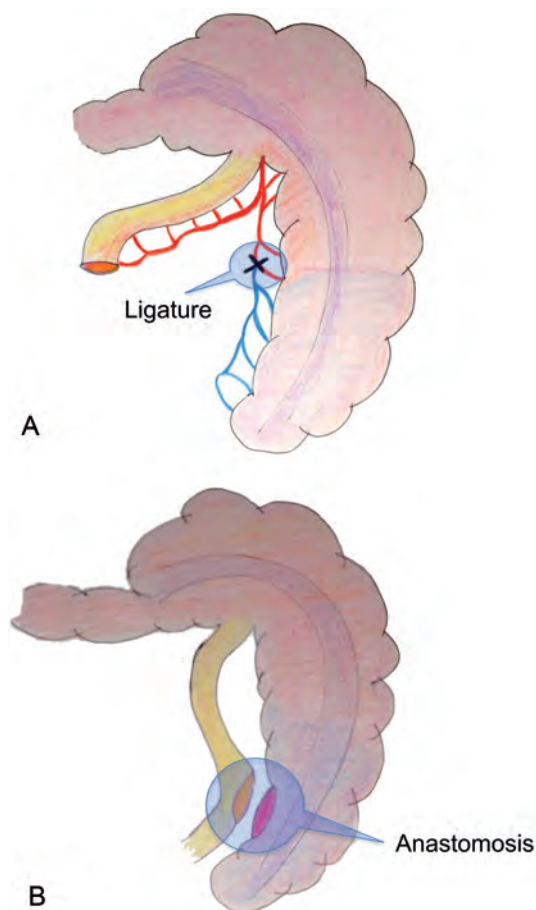


Fig. 1. Colonic devascularisation (A) and anastomotic conformation (B).

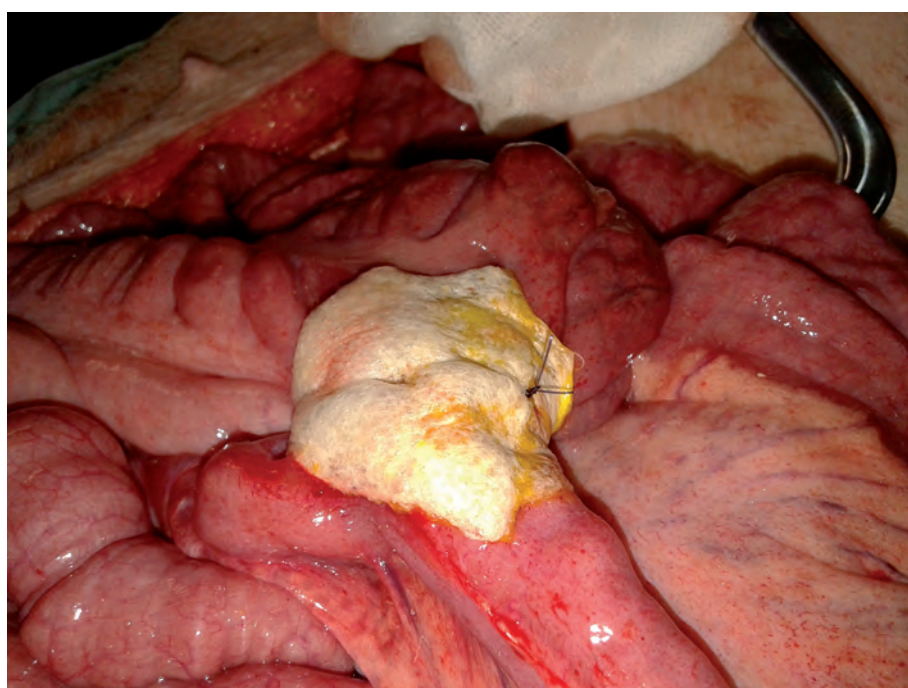
### *Changes on Tachosil® covered anastomoses*

covered group, we over-wrapped the entire anastomotic line with a collagen patch coated with fibrin glue components (Tachosil®-Takeda). The application

method (shown in Fig. 3) of the patch covering the intestinal suture was carried out as described previously in the literature (Suarez-Grau et al., 2016). In short we



**Fig. 2.** Anastomosis between terminal ileum and a segment of ischemic colonic tissue.



**Fig. 3.** Anastomosis with the Tachosil® patch overwrapping the intestinal suture.



divided the TachoSil® into two equal longitudinal parts and applied on both sides (anterior and posterior) of the anastomotic line with a light pressure using a wet gauze. In the animals randomized to the NCG, the anastomoses were left untouched. Finally, the laparotomy was closed using monofilament running sutures and the skin was approximated using staples.

After surgery, the animals were continuously monitored and fed for a period of 5 postoperative days. Animal care and observations during the postoperative period were performed by trained animal technicians supervised by the Animal Research Institute veterinary. On the 5<sup>th</sup> postoperative day (or before in the case of signs of surgical complications) the pigs were taken into the operating room to perform a new induction of general anaesthesia as described before. Then a new laparotomy was done along with evaluation of the abdominal cavity, resection of the anastomosis and fixation of the specimen and finally the subjects were euthanized with an overdose of the used anaesthetics and Pentobarbital.

#### Clinical variables

A first set of clinical variables were obtained at the time of surgery: animal characteristics, compliance with the surgical protocol, duration of surgery and observed intraoperative complications, and period of time to euthanasia. The surgeons described the operative findings at the time of the second operation. Abscess or leakage was defined as the presence of macroscopic defects. Abscesses were recorded as localized when pus was observed surrounding the anastomotic segment or diffused when we found free pus or faeces in the abdominal cavity. Adhesions observed between the anastomosis and the

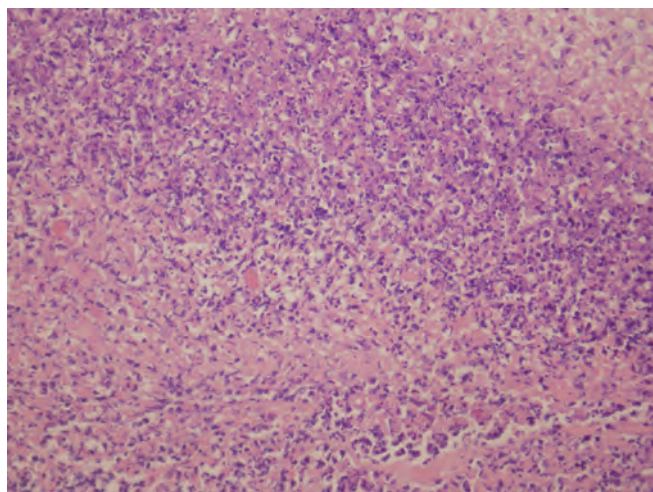
abdominal wall or between intestines were also reported using a grading scale (0 to 3) following the same scale as in Phase I (Kamil et al., 2014). Other additional findings such as the presence of perforations or other signs of necrosis over other intestinal segments, not involved in the suture, were also recorded.

#### Histopathological evaluation

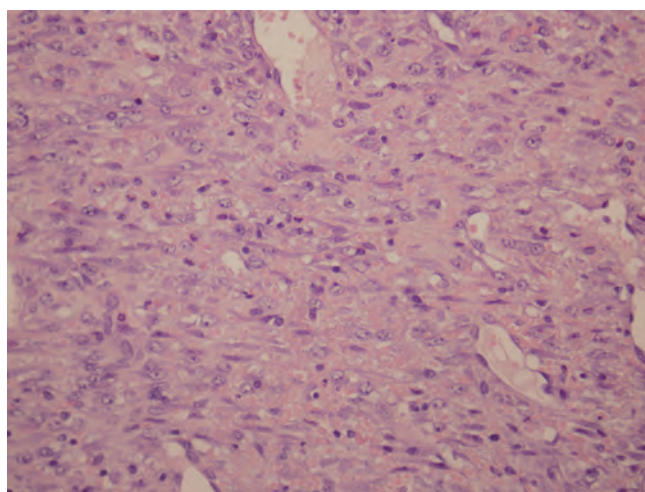
The evaluating pathologist was blinded to the type of intervention performed on each animal. The suture segment was fixed in a formaldehyde solution to perform then a hematoxylin-eosin technique. To record the histopathological features of the anastomotic bed we used the standard criteria settled by Ehrlich and modified by Phillips et al. (1992). In short, we evaluated the kind and intensity of inflammatory reaction, the formation of microabscess (Fig. 4), the presence of fibroblasts (Fig. 5) and collagen deposit. We also measured the percentage of necrosis within the anastomosis and the number and nature of the blood vessels present in the surgical bed (Fig. 6). We performed routine 5 micron-thick haematoxylin-eosin stained slides with masson's trichrome staining for collagen evaluation.

#### Statistical analysis

The results were recorded and analyzed for statistical significance using SPSS software® (version 22.0, SPSS Inc - IBM Corp, Chicago, IL) and SOFA (version 1.4.6; 2009-15 Paton-Simpson & Associates Ltd). After general descriptive statistics with percentages, we compared the differences between groups with chi-squared test. Significant differences were defined as having a p value <0.05.



**Fig. 4.** Microabscess formation at the interphase between peritoneum and fibrin patch. HE, x 200.



**Fig. 5.** Cellular fibroblastic response with little collagen deposition in the anastomotic bed. HE, x 200.

### Animal safety regulations

This study is in accordance with the Animal Experiment Legislation of Madrid Community and has been registered with number 10/129734.9/14. The study has also been reviewed and approved by the Ethical Review Board of our center.

## Results

### First phase

All 10 procedures were performed without complications, with a median intervention time of 23 minutes. During the kept period, all animals presented with normal behaviour, obtaining the diet and medication normally, and all subjects presented with regular bowel movements. All animals were sacrificed as per protocol at the 5th postoperative day.

From a macroscopic point of view, 3 animals (30%) had a macroscopic leakage, with local abscess and major

findings of faecal contamination without distant or diffuse peritonitis. The most frequent adhesion indexes were 1 and 3, without statistical significance in relation to the anastomotic leakage, possibly due to the small sample size. The microscopic study (Table 1) showed a polymorphonuclear dominance (median of 83,5%), 6 cases had important neovascularization, without relation to the presence of leakage. All the samples had signs of necrosis, with no difference of frequency between the focal or disseminate form.

### Second phase

A total of 33 pigs were included in this phase of the study. Four animals died due to anesthetic complication during surgery and one died before the end of the observation period and was excluded from the pathological analysis.

Therefore, we included in the present study, data from 29 animals. The median operation time was 25 minutes, 28 animals completed the observation period until being euthanized on the 5th postoperative day. The median weight was 35Kg. We included 12 (41.3%) males and 17 (58.7%) females. A resume of animal characteristics and clinical variables is showed in Table 2.

We performed the anastomosis on each pig without intraoperative surgical complications. A total of 15 (51.7%) anastomoses were randomized to the CG using the FS patch, while the rest, 14 (48.3%) were left untouched. A total of 28 of the 29 anastomoses were resected at the end point time and underwent pathological studies. One subject of the non-covered group died on the third postoperative day due to anastomotic leak, making it impossible to perform the reoperation.

The observed results on each study variable are presented in Table 3.

**Anastomotic leakage (by surgeons):** Macroscopic anastomotic leakage was defined as visible anastomotic defects and faecal peritonitis and was observed in 10 cases (8 non-covered vs. 2 covered), indicating a 34.5% of macroscopic leakage. The covering of anastomoses

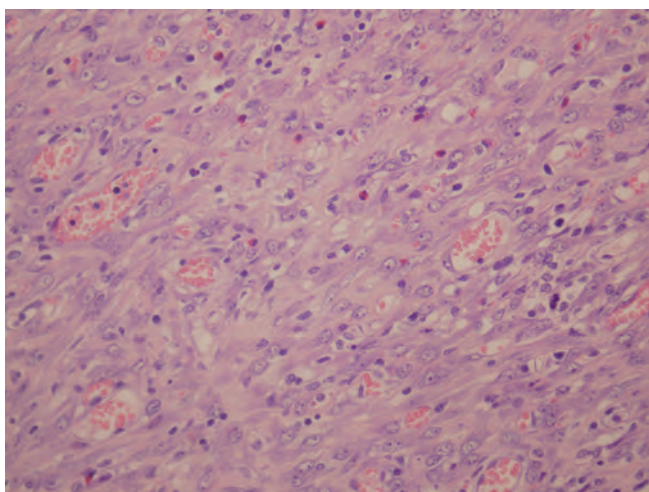


Fig. 6. Neovascularization in the anastomotic bed. HE, x 200.

Table 1. Microscopic Study.

ID	Fail	PMN	Lymph	Vessels	Fibroblast	Macrophages	Necrosis	Hemorrhage
1	No	80%	10%	Neoformed	++	10%	Focal	Diffuse
2	No	95%	5%	Mature	+++	<2%	Extensive	Focal
3	No	95%	5%	Mature	++	<2%	Extensive	Focal
4	No	65%	35%	Neoformed	++	<2%	Focal	Diffuse
5	No	95%	5%	Neoformed	++	<2%	Focal	Diffuse
6	Si	90%	10%	Neoformed	++	<2%	Focal	Diffuse
7	Si	70%	30%	Mature	+++	<2%	Extensive	Limited
8	No	85%	15%	Mature	+++	<2%	Extensive	Limited
9	No	75%	25%	Neoformed	++	5%	Focal	Limited
10	Si	85%	15%	Neoformed	++	<2%	Extensive	Diffuse

## Changes on Tachosil® covered anastomoses

**Table 2.** Animal characteristics and clinical variables.

Number	Gender	Weight	Cover
1	Male	35	Yes
2	Female	25	No
3	Male	30	Yes
4	Female	30	No
5	Female	30	Yes
6	Male	30	No
7	Male	32	No
8	Female	28	Yes
9	Male	27	Yes
10	Female	26	No
11	Male	27	Yes
12	Male	30	Yes
13	Male	27	Yes
14	Female	30	No
16	Male	29	No
17	Female	31	No
18	Female	26	Yes
19	Female	31	No
20	Female	26	Yes
21	Male	28	No
22	Female	27	No
23	Female	28	Yes
24	Male	26	No
25	Male	34	Yes
26	Female	24	Yes
27	Female	24	No
28	Female	30	Yes
29	Female	32	Yes
30	Female	35	No

with Tachosil® showed a significant reduction in the macroscopic leakage rate from 27.6% in the non-covered group vs. 6.9% in the covered group;  $p=0.013$ .

**Adhesions (by surgeons):** Adhesions between intestines and from the anastomosis to the abdominal wall were observed at the time of euthanasia in a high percentage of cases (19 cases; 76%). The covering of the anastomoses with Tachosil® did not have an impact in increasing these adherences; 40% of cases had adhesions in the covered group vs. 36% in the non-covered group;  $p=0.9$ .

**Abscess (by pathologist):** An overall of 53.5% of the animals showed abscesses in the histopathological analysis and most of these (80%) did not show macroscopic leakage. Histopathological analysis revealed a significantly higher rate of microabscesses in the animals treated with Tachosil® of 28.5% vs. 78.5%;  $p=0.01$ .

**Necrosis (by pathologist):** Some grade of necrosis, whether local or diffused was observed in all cases. In 11 cases (37.9%) diffused necrosis was observed, of them, 17.2% had a macroscopic leakage and 20.7% were normal;  $p=0.33$ . Necrosis was more localized in the Tachosil® group, but the difference did not reach

**Table 3.** Summary of histopathological features (expressed in absolute number).

Feature	Control group (14)	TachoSil (15)	P value
Anastomotic leakage	Absent: 6 Present: 8	Absent: 13 Present: 2	0.013
Adhesions	Absent: 9 Present: 5	Absent: 9 Present: 6	0.9
Abscess formation	Absent: 10 Present: 4	Absent: 4 Present: 11	0.01
Necrosis	Localized: 7 Widespread: 7	Localized: 11 Widespread: 4	0.2
Neovascularization	Absent: 8 Present: 6	Absent: 11 Present: 5	0.59

significance (50% vs. 71.5%);  $p=0.19$ .

**Inflammatory cell reaction (by pathologist):** Inflammatory cell reaction was observed in almost 50% of the samples. To note, the reinforcement of the anastomosis with Tachosil® did not show a correlation with an increased inflammatory reaction (46.7% showed visible inflammatory reactions in the covered group vs. 42.9% in the non-covered group);  $p=0.83$ .

**Neovascularization (by pathologist):** Neovascularization, defined as presence of immature vessels was observed in 11(37.9%) cases. The covering of the anastomosis with Tachosil® did not have a significant impact in the generation of vessels when comparing the percentage of immature vessels in the covered group 34.5% vs. 27.6% in the non-covered group;  $p=0.59$ .

**Other variables (by pathologist):** Collagen deposition, inflammatory lymphocytic reaction and fibroblastic proliferation were similar between groups.

## Discussion

The present randomized controlled study shows that covering the anastomosis with Tachosil® has a significant impact in decreasing macroscopic leakage in our experimental model. As we proposed in our principal hypothesis, we have validated an animal model for the study of the ischemic anastomosis, showing a 30% rate of anastomotic leakage in a species that may be considered an accurate reproduction of the human intestine (Pommergaard et al., 2011). From an ethical point of view, our model seems to be well tolerated by the subjects and generated a controlled amount of discomfort, with extensive alternatives to be reduced (analgesia, antibiotics).

Our findings are in line with what has been previously published in the literature. In a non-randomized study published (Nordentoft and Holte, 2014) using Tachosil® in pigs (to our knowledge, our study is the second one using pigs as an experimental



model), they also reported a significant decrease in leakage. This previous study has some differences compared to ours, as the author induced a standardized defect in the anastomosis, and consequently reported a higher leak rate than ours. We believe that our experimental model is a better one, as surgeons, since in a real setting a defect in the anastomosis would not be created, although, it is quite common to perform intestinal anastomoses in critical situations. Another study (Tallón-Aguilar et al., 2015) using a murine model performed a histopathological analysis of the anastomotic tissue and reported a benefit in using Tachosil® covering colonic perforations, as in our results, a high percentage of abscess.

The experience in colonic surgery is not homogeneous and recent literature seems to indicate that the use of fibrin sealants (TachoSil) in anastomoses is a safe alternative (Nordentoft et al., 2007; Suarez-Grau et al., 2016). In this study, a systematic review shows varying results (Nordentoft et al., 2015), and we feel this fact can be explained by the lack of homogeneity of the reported studies. Most of the work is experimental and has been performed in different animal models. We have performed a conventional anastomosis on an ischemic colon segment, but we have not created any artificial defect in the anastomosis itself. It could be expected that the rate of complications in the present study mimics better the one found in usual ischemic anastomosis. For ethical and practical reasons, it would be extremely difficult to perform controlled experimental studies of the present kind in human beings and we feel pig models are the best reflection of the actual situation in humans (Pommergaard et al., 2011).

From a macroscopic point of view, TachoSil® seems to be a good candidate to control anastomotic failure due to the presence of a stable collagen base that may work as a control to the fluids with the help of the fibrin adhesive capacities. Finding a reduced rate of macroscopic failure in the CG may be in line with this capacity to contain fluids and contamination, reducing the rate of macroscopic peritonitis and thus this, reducing the clinical manifestation of said peritonitis. On the other hand, this physical characteristic of a semi-rigid patch may also justify the presence of an augmented rate of abscess in the perianastomotic area and an apparent, but non statistical significant increment on the perianastomotic adhesions.

Therefore, we consider that our experimental model shows a strong correlation with clinical situations as no controlled clinical studies with respect to TachoSil® and hypoperfused intestinal sutures have been performed in humans to date. Another positive effect seen in the present study is that, although adhesions between intestines and to the abdominal wall were frequently seen in the study (76%), these adhesions were not increased by the use of the patch. The high percentage of adhesions may be explained by local inflammatory fibrosis due to tissue necrosis and we have not reported intestinal obstructions due to the use of the patch.

As for histopathological analysis of the anastomotic bed after fibrin sealant use, we have found two previous studies, but they chose a murine model, (Tallón-Aguilar et al., 2015; Suarez-Grau et al., 2016). These authors designed two experimental murine models to validate their clinical observations and proposed that TachoSil® behaves both as a sealing and therapeutic agent rather than being a mere reinforcement of the sutures, probably acting in the prevention of the anastomotic leak more as a physical barrier. We find it worth noting that they also found in this experimental model a higher percentage of microabscesses in the group receiving TachoSil® patches. We have confirmed their finding, but we believe the patch can act as a means of containment for inflammatory reaction. Necrosis and acute inflammation may tend to be more localized in animals treated with TachoSil® and this is associated to a lower rate of macroscopic anastomosis leakage. It might be postulated that TachoSil® contains inflammation and reduces the risk of spill over the peritoneal cavity through both a mechanical and hemostatic effect on the surgical bed. The presence of abscesses in the anastomosis could generate fear of potential infectious complications after surgery, but use of TachoSil® in kidney and pancreatic transplant surgery (Padillo et al., 2010) has been associated to a significant reduction of intraabdominal infectious complications and length of stay in hospital. During clinical follow-up we found no significant differences in the rate of fever or any other signs indicative of infectious complications, enabling us to argue microabscesses are not harbingers of more dangerous intraabdominal infectious complications. Despite this, our study was not specifically designed to test this issue and animals were euthanized too soon after surgery to draw solid conclusions regarding this issue. Future studies with longer postoperative follow-up should settle this matter.

We consider our animal model a valid imitation of the regular surgical practice. However, new promising techniques have arisen in recent years as the intraoperative indocyanine green evaluation of the anastomosis may modify the way the surgeons see anastomosis, reducing the number of ischemic anastomosis. Also, we think that a collagen analysis of the specimen could have given more information on the healing process of the anastomosed intestine. Due to the high rate of failure we do not think that a bursting pressure analysis could have given any more useful information.

### *Conclusions*

Our porcine experimental model is a simple, effective, and feasible model for the study of anastomotic leakage after colonic surgery. The employment of a Tachosil® patch over high-risk anastomosis has a positive effect on reducing the rate and clinical consequences of anastomosis failures. However, a higher rate of local abscess is expected, as

the positive effect of the patch is due to a mechanical contention of the infection.

---

*Acknowledgements:* The authors thank Sara Rosenstone Calvo M.D. and Patricia Tejedor M.D. for editing this manuscript.

---

## References

- Branagan G. and Finnis D. (2005). Prognosis after anastomotic leakage in colorectal surgery. *Dis. Colon Rectum* 48, 1021-1026.
- Buchs N.C., Gervaz P., Secic M., Bucher P., Mugnier-Konrad B. and Morel P. (2008). Incidence, consequences, and risk factors for anastomotic dehiscence after colorectal surgery: a prospective monocentric study. *Int. J. Colorectal Dis.* 23, 265-270.
- Di Carlo I., Pulvirenti E. and Toro A. (2009). Use of fibrinogen and thrombin-coated patch for peptic ulcer perforation repair. *Hepatogastroenterology* 56, 575-577.
- EPAR-EMA reports. (2009). TachoSil - EMA/187384/2016 - EMEA/H/C/000505.
- Kamil M.Y., Okan I., Dursun N., Bas G., Alimoglu O., Kaya B., Odabasi M. and Sahin M. (2014). Effect of orally administered simvastatin on prevention of postoperative adhesion in rats. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 7, 405-410.
- Lang G., Cseskeö A., Stamatis G., Lampl L., Hagman L., Marta G.M., Mueller M.R. and Klepetko W. (2004). Efficacy and safety of topical application of human fibrinogen/thrombin-coated collagen patch (TachoComb) for treatment of air leakage after standard lobectomy. *Eur. J. Cardiothoracic. Surg.* 25, 160-166.
- Nordentoft T., Rømer J. and Sørensen M. (2007). Sealing of gastrointestinal anastomoses with fibrin glue coated collagen patch: a safety study. *J. Invest. Surg.* 20, 363-369.
- Nordentoft T. and Holte K. (2014). Preventing clinical leakage of colonic anastomoses with a fibrin-coated collagen patch sealing- An experimental study. *Arch. Clin. Exp. Surg.* 3, 201-206.
- Nordentoft T., Pommergaard H.-C., Rosenberg J. and Bachiam M.P. (2015). Fibrin glue does not improve healing of gastrointestinal anastomoses: A systematic review. *Eur. Surg. Res.* 54, 1-13.
- Padillo J., Arjona-Sanchez A., Ruiz-Rabelo J., Regueiro J.C., Canis M. and Rodriguez-Benot A. (2010). Human fibrinogen patches application reduces intra-abdominal infectious complications in pancreas transplant with enteric drainage. *World J. Surg.* 34, 2991-2996.
- Phillips J.D., Kim C.S., Fonkalsrud E.W., Zeng H. and Dindar H. (1992). Effects of chronic corticosteroids and vitamin A on the healing of intestinal anastomoses. *Am. J. Surg.* 163, 71-77.
- Pommergaard H.C., Rosenberg J., Schumacher-Petersen C. and Achiam M.P. (2011). Choosing the best animal species to mimic clinical colon anastomotic leakage in humans: a qualitative systematic review. *Eur. Surg. Res.* 47, 173-81.
- Suárez-Grau J.M., Bernardos García C., Cepeda Franco C., Mendez García C., García Ruiz S., DocoboDurantez F., Morales-Conde S. and Padillo Ruiz J. (2016). Fibrinogen-thrombin collagen patch reinforcement of high-risk colonic anastomoses in rats. *World J. Gastrointest. Surg.* 8, 627-633.
- Tallón-Aguilar L., Lopez- Bernal F., Muntane-Relat J., García-Martínez J.A., Castillo-Sanchez E. and Padillo-Ruiz J. (2015). The use of tachosil as sealant in an experimental model of colonic perforation. *Surgical Innovation* 22, 54-60.
- Walker K.G., Bell S.W., Rickard M.J., Mehanna D., Dent O.F., Chapuis P.H. and Bokey E.L. (2004). Anastomotic leakage is predictive of diminished survival after potentially curative resection for colorectal cancer. *Ann. Surg.* 240, 255-259.

Accepted September 7, 2017



## FE DE ERRATA

Los porcentajes de fuga anastomótica expresados en ambos grupos son incorrectos, ya que se ha realizado el cálculo sin tener en cuenta el porcentaje de forma global. Los nuevos valores expresan el porcentaje global de dehiscencia anastomótica (34,5%) y por subgrupos de forma global: 13,3% en el grupo casos vs. 57,1% en el grupo control. Dicha variación no afecta al análisis estadístico ya que se observan, del mismo modo que con los anteriores, diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos .

Se ha notificado a la revista de dicha publicación para que se publique la respectiva fe de errata.

### 5.3 Tercera publicación:

TITULO: Fibrin patch influences the expression of HIF-1 $\alpha$  and NF- $\kappa$ Bp65 factors on ischemic intestinal anastomosis.

AUTORES: Carlos García-Vásquez, María J Fernández-Aceñero<sup>2</sup>, María S García Gómez-Heras and Carlos Pastor.

REVISTA: Experimental Biology and Medicine.

FI: 2.413 (2017). Q1: Medicine (miscellaneous) (SJR 2017).

#### RESUMEN DEL ESTUDIO:

El factor inducible por hipoxia es un importante eslabón no solo en la respuesta ante la isquemia tisular, sino también esta relaciona de forma íntima pero no totalmente conocida hasta ahora, con los procesos reparadores de la célula y tejidos. De la misma manera, la familia de los Factores Nucleares  $\kappa$ B también se relaciona con la respuesta y reparación tisular.

En este último estudio exponemos los resultados de análisis de la expresión por inmunohistoquímica de ambos factores ante la presencia del parche de fibrina en el tejido anastomótico comparado con tejido normal.

La valoración inmunohistoquímica encontró un aumento significativo de la expresión del  $\kappa$ B-p65 con una modificación en el patrón de expresión del HIF-1 $\alpha$  tornándose de una predominancia nuclear en el grupo control en la zona sometida a isquemia una expresión mayoritariamente citoplasmática en todas las áreas de la muestra del grupo de estudio.

# Original Research

## Fibrin patch influences the expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ and nuclear factor- $\kappa$ Bp65 factors on ischemic intestinal anastomosis

Carlos García-Vásquez<sup>1</sup> , María J Fernández-Aceñero<sup>2</sup>, Soledad García Gómez-Heras<sup>3</sup> and Carlos Pastor<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Hospital Universitario Infanta Elena, Madrid, 28342, Spain; <sup>2</sup>Hospital Clínico San Carlos, Madrid, 28040, Spain; <sup>3</sup>Faculty of Health Science, Rey Juan Carlos University, Madrid, 28933, Spain; <sup>4</sup>Fundación Jiménez Díaz, Madrid, 28040, Spain  
Corresponding author: Carlos García-Vásquez. Email: cgarciava@quironsalud.es

### Impact statement

The consequences of the anastomotic failure are dramatic for patients. Understanding how the ever-increasing use of fibrin sealant, that seems to have a beneficial effect on the anastomoses, interacts with the tissue and the healing process can help to justify its use and encourage research on how to improve this effect even more. We feel that the present work shows that the patch can improve healing by complex mechanisms other than the mere contention and physical support of the intestine. Furthermore, research is needed to confirm our preliminary findings.

### Abstract

The intestinal anastomotic failure is one of the most severe complications in gastrointestinal surgery. Despite the great surgical improvements during the last decade, anastomotic leak rates remain practically the same, with a dramatically high grade of morbidity for patients. Leakages are usually the final consequence of ischemia in the anastomosis, leading to tissue hypoxia. In response to hypoxia, the cell orchestrates a variety of coordinated responses in order to restore oxygen homeostasis. The molecular mechanism of hypoxia sensitivity involves oxygen sensing hydroxylases, prolyl-hydroxylases, orchestrating two main transcription factors related to induction of inflammation and angiogenesis, namely nuclear factor- $\kappa$ B and hypoxia-inducible factors. The immunohistochemical expression of two transcription factors hypoxia-inducible factors-1 $\alpha$  and nuclear factor- $\kappa$ B p65 has already been described in several disorders, including wound healing, asthma and chronic

obstructive lung disease, rheumatoid arthritis, cancer, inflammatory bowel disease, and acute colitis. In the surgical field, fibrin sealants have been widely used to prevent leaks in lung surgery and they might also be useful as a reinforcement of sutures in intestinal anastomosis. The commercial fibrin sealant patches are hemostatic and adhesive surgical agents mainly derived from human plasma. We herein report the results of a prospective randomized experimental study on pigs. We performed a high-risk leakage model of bowel anastomosis, causing a significant devascularization of 10–15 cm of the bowel wall before performing a conventional colo-ileal anastomosis. We randomized the animals to receive a covering of the anastomosis with a fibrin patch (case group) or not (control group). We report the changes in the immunohistochemical expression of the proteins involved in tissue response to hypoxia in the experimental model. Our results indicate that the fibrin patch delays the healing response, promoting a longer lasting inflammation in the surgical bed. Nevertheless, the fibrin patches effectiveness to reduce dehiscence shown in clinical practice suggests that this delay does not negatively affect patients' outcome.

**Keywords:** Intestine, healing, ischemia, surgery, immunohistochemistry, interactions

*Experimental Biology and Medicine* 2018; 243: 803–808. DOI: 10.1177/1535370218777216

### Introduction

The intestinal anastomotic failure is one of the most severe complications in gastrointestinal surgery. Despite the great surgical improvements during the last decade, such as the

implementation of minimally invasive surgery, anastomotic leak rates remain practically the same, with a dramatically high grade of morbidity for patients. Anastomotic leakage may be as high as 10% following elective colorectal

surgery, but it could even reach 20–30% in emergent cases. Once the leakage is present, management options usually require an emergent reoperation with subsequent stoma diversion. The mortality rate of this complication may reach 13–27%.<sup>1</sup>

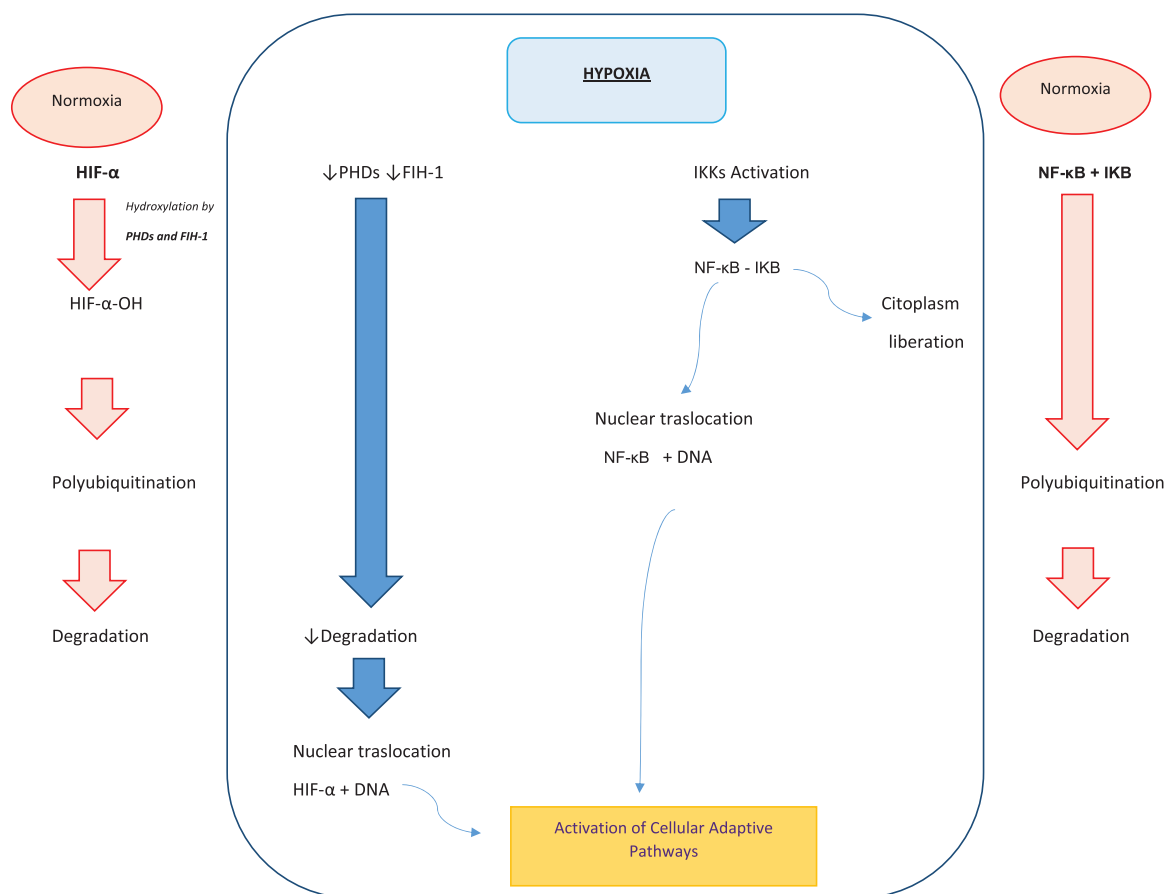
Anastomotic leakages usually are the final consequence of ischemia in the intestinal anastomosis, leading to tissue hypoxia. In response to hypoxia, the cell orchestrates a variety of coordinated responses in order to restore oxygen homeostasis. The molecular mechanism of hypoxia sensitivity involves oxygen sensing hydroxylases, prolyl hydroxylases (PHDs), enzymes orchestrating two main transcription factors related to induction of inflammation and angiogenesis, nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) and hypoxia-inducible factors (HIFs).<sup>2</sup> Under normoxia, HIF- $\alpha$  subunits (HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , and HIF-3 $\alpha$ ) are hydroxylated by PHDs and asparaginyl hydroxylase factor (FIH-1), which facilitate the labeling of HIF- $\alpha$ -OH by von Hippel Lindau protein (pVHL), polyubiquitination, and protein degradation of HIF- $\alpha$  by the proteasome. The activity of HIF-1 is oxygen-dependent. When the oxygen levels decrease, the PHD enzymes lose their activity, the hydroxylation of the HIF- $\alpha$  subunit is inhibited and proteasomal degradation fails. The non-hydroxylated-stabilized HIF- $\alpha$  subunits translocate to the nucleus where they dimerize with constitutively expressed HIF- $\beta$  subunits, bind to DNA, and initiate gene transcription of the adaptive pathways to enable cellular adaptation to a hypoxic environment through promotion

of angiogenesis, cell proliferation and migration, increased glycolytic metabolism, and cell survival (Figure 1).<sup>3</sup>

Another important factor involved in tissue response to hypoxia is NF- $\kappa$ B.<sup>4–7</sup> NF- $\kappa$ B is a family of transcription factors composed by RelA (NF- $\kappa$ B-p65), RelB, cRel, NF- $\kappa$ B1 (p105/p50), and NF- $\kappa$ B2 (p100/p52). Within a normoxia environment, the inactive NF- $\kappa$ B dimer is present in the cytosol bound to inhibitory proteins  $\kappa$ B (I $\kappa$ B). Activation of NF- $\kappa$ B requires the release of I $\kappa$ B from the complex; this release is induced by its phosphorylation by a multi-protein I $\kappa$ B-kinase complex containing I $\kappa$ B-kinase (IKK) and b. This phosphorylation is induced by hypoxia. This is followed by the translocation of the activated NF- $\kappa$ B into the nucleus. There, NF- $\kappa$ B binds to specific base pair sequences (KB sites) to activate a regulatory network in response (Figure 1).

The immunohistochemical (IHC) expression of both transcription factors HIF-1 $\alpha$  and NF- $\kappa$ B p65 has already been described in several disorders, including wound healing, asthma and chronic obstructive lung disease, rheumatoid arthritis, cancer, inflammatory bowel disease, and acute colitis.<sup>3,8</sup>

In the surgical field, fibrin sealants in their various forms have been widely used to prevent leaks in lung surgery and they might also be useful as a reinforcement or replacement of sutures in intestinal anastomosis. The current commercial fibrin sealant patches (Tachosil<sup>®</sup>, Takeda Company) are hemostatic and adhesive surgical agents mainly derived



**Figure 1.** Adaptive pathways in cell adaptation to a hypoxic environment. (A color version of this figure is available in the online journal.)

from human plasma. Their function is to reproduce the final steps in the coagulation cascade to form a fibrin clot that will prevent blood loss and assist in the healing process. The literature, and the EPAR-EMEA report, have assessed their efficacy and safety and show that their clinical use is safe and accepted in humans.<sup>9,10</sup>

To date, the role of fibrin sealants on preventing anastomotic leakage as well as their behavior under hypoxia conditions is under investigation. In a recent report from our group, we confirmed the efficacy of Tachosil<sup>®</sup> in decreasing anastomotic leakage rates in an experimental model of ischemic sutures in pigs. Overall, we observed a significant reduction of the rate and clinical consequences of anastomotic failures.<sup>11</sup> However, a higher rate of local abscess was observed due to the patch employment.<sup>11</sup>

Therefore, the present study aims to first, validate whether our experimental model of ischemic intestinal anastomotic sutures cause hypoxia; second, to define the patterns of IHC expression of markers of response to hypoxia (HIF-1 $\alpha$  and NF- $\kappa$ B-p65) caused by the experimental model and third, to analyze potential histological or IHC changes when a Tachosil<sup>®</sup> patch is employed to cover the anastomotic sutures.

## Material and methods

A prospective randomized experimental study was proposed using large white pigs. We included 30 male pigs (between 27 kg and 32 kg) in which we performed a high-risk leakage model of bowel anastomosis. The surgeons obtained a significant devascularization of 10 cm of the bowel wall on each side, before performing the sutures, and then created a colo-ileal anastomosis in the same way as performed in the regular clinical practice. Thereafter, we randomized the animals to receive a Tachosil<sup>®</sup> covering of the anastomosis (case group) versus no covering (control group). After fifth postoperative days, the animals were reoperated and the anastomotic specimens were sent to the Pathology Department. A description of our protocol was published in detail in our previous study.<sup>11</sup> All the animals were cared for as per requirements of the regional Animal Experiments Inspectorate (Registered as number: 10/129734.9/14). As required, the study obtained the Institutional Review Board (IRB) approval at our institution (IIS-FJD).

The pathologists performed a standard gross analysis of the specimens and selected samples for paraffin-embedding. In all the cases, we selected at least five representative areas from the anastomosis and performed routine hematoxylin-eosin stains. In these slides, we measured inflammation, fibrosis, and neovascularization, following standard grading systems for this type of ischemia model.<sup>10</sup>

Neovascularization was counted manually on D2–40 stained slides.

Thereafter, we chose a representative paraffin block from each case and performed IHC for NF- $\kappa$ B-p65 and HIF-1 $\alpha$ . All the IHC techniques were performed in the Human Histology and Pathology Department, University Rey Juan Carlos (Alcorcón, Spain). Antigen retrieval was performed for 20 min at 95°C in high pH-buffered solution.

Endogenous peroxidase was blocked, by immersing the sections in 0.03% hydrogen peroxide for 5 min. Slides were washed for 5 min with Tris-buffered saline solution containing Tween 20 at pH 7.6 and incubated with the primary antibodies anti-NF- $\kappa$ B-p65 (NF- $\kappa$ B-p65 antibody, bs-0465R, Bioss, 1/100) and anti-HIF-1 $\alpha$  (anti-HIF1- $\alpha$  antibody, GTX30105, Gene Tex<sup>®</sup>, 1/1000) for 20 min at room temperature, followed by incubation with the appropriate anti-Ig horseradish peroxidase-conjugated polymer to detect antigen-antibody (MasVision Universal, Master Diagnostica, Ref. MAD-041880QK-U). Sections were then visualized with 3,3'-diaminobenzidine as a chromogen for 5 min and counterstained with hematoxylin. All IHC stains were performed manually.

Immunohistochemistry was evaluated and measured by two independent pathologists blinded to the group to which the animal belonged. We both measured the percentage of cells expressing the marker and described the location of the expression (endothelium, inflammatory cells, crypt base, fibroblasts) and also the cell location of the staining. HIF- $\alpha$  is expressed in the cell cytoplasm as a response to mild hypoxemia, and when hypoxemia worsens, expression becomes both cytoplasmic and nuclear. In advanced stages, expression can become limited to the nuclei. On the other hand, NF- $\kappa$ B is only nuclear and it becomes positive under hypoxemic conditions.

Concordance between observers was established with Kappa correlation coefficient.

Data were analyzed with SPSS for Windows 20.0 statistical package (IBMO corporation). Association between IHC expression and histopathological variables was evaluated by chi-squared (or Fisher's exact test). The level of statistical significance was defined as a *P* value less than 0.05.

## Results

We have analyzed the pattern of IHC expression of HIF-1 $\alpha$  and NF- $\kappa$ B-p65, both in covered and uncovered anastomosis. Results are shown on Table 1, describing the percentage, location, and intensity of IHC expression of the markers in both groups.

We first analyzed the IHC pattern in uncovered anastomosis and found a significant increase of HIF-1 $\alpha$  and NF- $\kappa$ B-p65 when comparing the samples from the surgical bed to normal nearby tissue. Of note, we have found exclusively nuclear positivity for HIF-1 $\alpha$  in the epithelial cells from the basal crypts adjacent the surgical bed as opposed to cytoplasmic and nuclear expression in the other compartments of the sample (endothelia, fibroblasts, Figures 2 and 3). This pattern of expression was not found in the epithelial cells located far from the anastomotic bed. As for NF- $\kappa$ B, we have only found an increased expression in the fibroblasts of the surgical bed, which is significantly higher as in normal tissue fibroblasts and endothelium (Figure 4).

Second, we compared the pattern of expression in animals receiving the Tachosil<sup>®</sup> patch and control animals. The most relevant finding is HIF-1 $\alpha$  expression becomes cytoplasmic in all the compartments, with a significant reduction of nuclear expression in the basal compartment

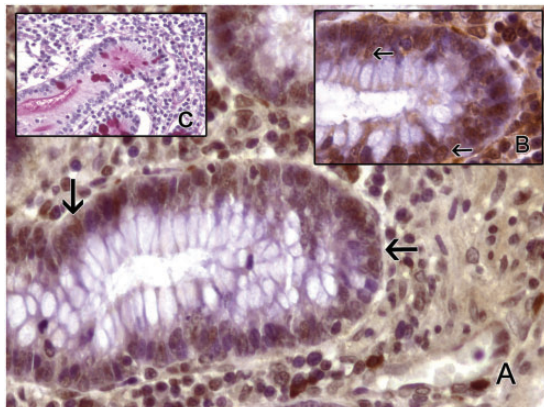


**Table 1.** Percentage of expression and intracellular location of HIF-1 $\alpha$  and NF- $\kappa$ B-p65 in the surgical bed and the surrounding normal tissues.

	HIF-1 $\alpha$				NF- $\kappa$ B-p65	
	Control group		Tachosil group		Control group	Tachosil group
	% Expression	Intracellular location	% Expression	Intracellular location	% Expression	% Expression
Crypts						
Basal cells	20%*	Citopl. 46.1%* C + N 38.4% Nuclear 15.38%	41.6%	Citopl. 60%* C + N 10% Nuclear 30%	13.3%	12.5%
Lamina propria						
Fibroblasts	80%*	Citopl. 0%* C + N 100% Nuclear 0%	50%	Citopl. 8.3%* C + N 91.6% Nuclear 0%	46.6%	63.6%
Endothelium	80%*	Citopl. 0% C + N 100% Nuclear 0%	50%	Citopl. 0% C + N 100% Nuclear 0%	46.6%	45.5%
Surgical bed						
Fibroblasts	100%*	Citopl. 0%* C + N 100% Nuclear 0%	83.3%	Citopl. 25%* C + N 75% Nuclear 0%	80%	90.9%
Endothelium	100%*	Citopl. 0%* C + N 100% Nuclear 0%	75%	Citopl. 25%* C + N 75% Nuclear 0%	33%	72.7%*

HIF: hypoxia-inducible factor; NF: nuclear factor.

\*Statistically significant.

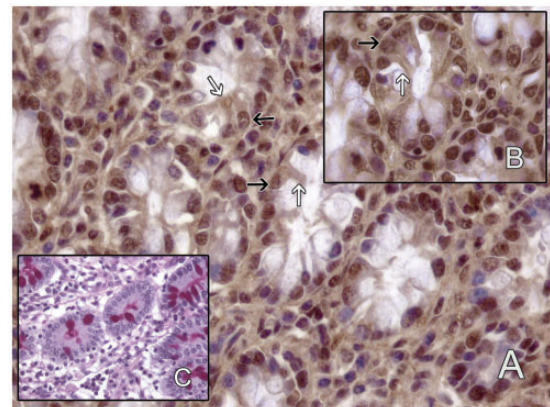
**Figure 2.** Bowel mucosa stained for HIF-1 $\alpha$  in control group. Only nuclear positivity is found (arrow). PAS stain highlights goblet cells. (a, b) Immunohistochemistry with anti-HIF-1 $\alpha$ . (a) 400 $\times$ . (b) 1000 $\times$ . (c) PAS 400 $\times$ . (A color version of this figure is available in the online journal.)

(35% to 10%;  $P = 0.04$ ). We have found no significant differences in the expression of NF- $\kappa$ B due to the patch.

As for the association with other histopathologic parameters (Table 2), we have found a statistically significant association between HIF-1 $\alpha$  cytoplasmic expression and more intense inflammatory infiltrates ( $P = 0.04$ ). Expression of NF- $\kappa$ B-p65 has been significantly more intense in the endothelial cells of the surgical bed.

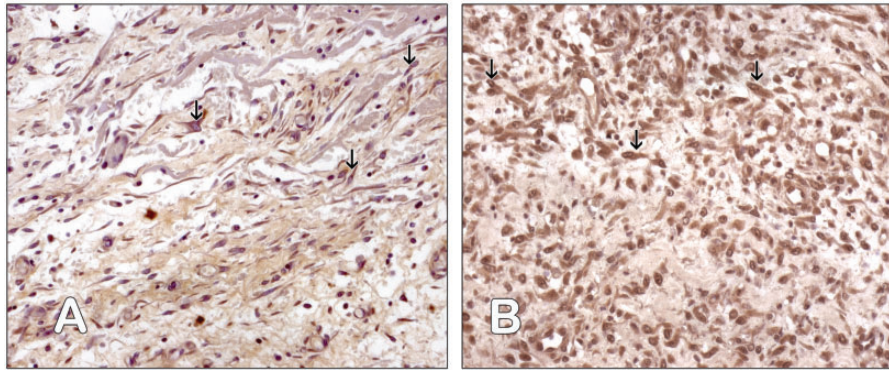
## Discussion

The present study shows HIF-1 $\alpha$  expression in control tissue, therefore validating the utility of this experimental model for the study of ischemia. Hypoxia is a very important event in

**Figure 3.** Bowel mucosa stained for HIF-1 $\alpha$  in Tachosil group. Nuclear (black arrow) and cytoplasmic positivity (white arrow) is found. PAS stain confirms that the number of goblet cells is similar in control and Tachosil groups. (a, b) Immunohistochemistry with anti-HIF-1 $\alpha$ . (a) 400 $\times$ . (b) 1000 $\times$ . (c) PAS 400 $\times$ . (A color version of this figure is available in the online journal.)

many human diseases, including tumor development and growth, but it is an important complication following surgery that can lead to anastomotic leakage which clearly increases the morbidity and mortality after surgery.<sup>12</sup> The discovery of HIF-1 $\alpha$  has shed much light into the molecular pathways that underlie tissue response to hypoxia. It has now become clear that HIF-1 can activate many downstream genes that are collectively known as hypoxia-responsive genes (HRGs) and are involved in the cellular proliferation aimed to heal the injuries caused by hypoxia and restore normal tissue structure.<sup>13</sup>

However, HIF-1 $\alpha$  is not the only factor involved in these pathways and it cross-reacts with other molecules, like



**Figure 4.** Surgical field of Tachosil Group. (a) Fibroblasts cytoplasm is positive for anti-HIF-1 $\alpha$  antibody (arrow). Immunohistochemistry anti-HIF-1 $\alpha$ , PAP, 200 $\times$ . (b) The cytoplasm and the nuclei of the fibroblasts are positive for anti-NF- $\kappa$ B-p65 antibody (arrow). Immunohistochemistry anti-NF- $\kappa$ B-p65, PAP, 200 $\times$ . (A color version of this figure is available in the online journal.)

**Table 2.** Histopathologic parameters in the surgical bed and the surrounding normal tissues.

	HIF-1 $\alpha$				NF- $\kappa$ B-p65			
	Inflammatory reaction		Neovascularization <sup>a</sup>		Inflammatory reaction		Neovascularization <sup>a</sup>	
	Control group	Tachosil group	Control group	Tachosil group	Control group	Tachosil group	Control group	Tachosil group
Crypts								
Basal cells	16.6%	14.2%	33.3%	40%	0%	0%	16.6%	20%
Lamina propia								
Fibroblasts	66.6%	57.1%*	83.3%	60%	33.3%	42.8%	33.3%	60%
Endothelium	100%	28.5%*	100%	60%	50%	28.5%	16.6%	40%
Surgical bed								
Fibroblasts	100%	57.1%*	100%	60%	50%	57.1%	66.6%	60%
Endothelium	100%	42.8%*	100%	60%	33.3%	57.1%	50%	60%

HIF: hypoxia-inducible factor; NF: nuclear factor.

<sup>a</sup>Counted manually on D2-40 stained slides.

\*Statistically significant.

NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B increases HIF-1 $\alpha$  gene translation as shown in many experimental models and cell lines, but it also seems HIF-1 $\alpha$  can increase NF- $\kappa$ B-p65 in a reciprocal relationship. NF- $\kappa$ B is a large family of molecules, of which RelA (p65), p50, and c-Rel are the best understood. Besides it seems clear that the interaction between these complex pathways can change depending on the cell or tissue type, to gain the desired biological effect in each case.<sup>2,7</sup>

For the present study, we have chosen an experimental model in pigs that mimics gastrointestinal surgery under hypoxic conditions and it is considered one of the best models to test strategies to improve surgery in human cases, including the effects of fibrin patches.<sup>14</sup> This kind of fibrin sealants is being increasingly used in human practice to improve sealing and prevent dehiscence. There have been previous reports describing the histopathological changes in the hypoxic intestine in this model and some groups, including ours,<sup>11</sup> have shown that significantly more inflammation is associated to the presence of the patch, but the number of dehiscences is significantly decreased, therefore confirming the expected clinical effects.<sup>3,8</sup> To the best of our knowledge, no previous report has analyzed the molecular pathways controlling hypoxia in this model. To highlight this issue,

we have chosen p65 (part of the NF- $\kappa$ B complex) and HIF-1 $\alpha$  IHC expression to see whether the patch determines significant changes in the molecular pathways underlying tissue response to hypoxia.

In the first part of the work, we have analyzed the normal expression of these molecules in the control surgeries, without any fibrin patch. As expected we have found the HIF-1 $\alpha$  is translocated into the nuclei in the basal crypts. Previous experimental work, mainly in tumor development models, has shown that HIF-1 $\alpha$  accumulates in the cytoplasm under hypoxic conditions and then it is translocated to the nucleus, where it binds to HIF-1 $\beta$  and promotes the transcription of downstream genes that mediate cell proliferation.<sup>13</sup>

Our results are in accordance with these findings, for we have also shown nuclear expression in the epithelial crypt cells of the surgical bed, aimed to heal the damaged area. Besides we have seen a high expression of NF- $\kappa$ B in the fibroblasts of the surgical bed, also in accordance with a local healing response.

When comparing the changes in the control model and the model covered by Tachosil®, we have noticed a significant decrease in nuclear expression of HIF-1 $\alpha$  and a higher expression of NF- $\kappa$ B-p65 in endothelial cells of the surgical

bed. The reduction in nuclear HIF-1 $\alpha$  seems to indicate a delay in the activation of the nuclear downstream signals regulating cell proliferation and could be a sign of a certain delay in the healing proliferative response in the surgical bed. In a previous report,<sup>11</sup> we showed that the patch induced more inflammation with abscess formation in the surgical site and this inflammatory reaction is associated to more vascularization, as expected, and could be molecularly reflected in the higher expression of NF- $\kappa$ B-p65.

We can consider this translocation of HIF-1 $\alpha$  into the nuclei as a sign of cell cycle activation aimed to regenerate the injured tissues. We also feel NF- $\kappa$ B-p65 expression in fibroblasts speaks of a tissue reaction to facilitate healing. In summary, we feel the presence of the patch is associated to a more intense inflammatory reaction that delays the tissue response to hypoxia as shown by the lack of translocation of HIF-1 $\alpha$  into the cell nuclei at the crypts base. On the other hand, the patch enhances neovascularization mediated by NF- $\kappa$ B-p65, in an attempt to heal the tissue after inflammatory reaction. However, these findings are not contradictory with the clinical effect we have already reported of a significant reduction of anastomotic leakage.<sup>11</sup> We feel the delay in the molecular events of healing is counterbalanced with the scaffold effect of the fibrin patch, that limits inflammatory reaction to the area of the patch, therefore reducing the risk of widespread inflammation of the surgical bed with subsequent negative effects on suture stability. Scaffold effect can partially explain the reduction of leakage, despite delayed healing and could explain the positive effect of the patch, already shown by many authors.<sup>15</sup>

In summary, we herein report the changes in the IHC expression of the proteins involved in tissue response to hypoxia in a pig experimental model of high-risk suture in gastrointestinal surgery. Our results indicate that the fibrin patch delays the healing response, promoting a longer lasting inflammation in the surgical bed. However, as said before, fibrin patches are effective in clinical practice to reduce dehiscence, as also confirmed by our group, and it does not seem this delay negatively affect patients' outcome.

**Authors' contributions:** All persons who meet authorship criteria are listed as authors, and all authors certify that they have participated sufficiently in the work to take public responsibility for the content, including participation in the concept, design, analysis, writing, or revision of the manuscript. Furthermore, each author certifies that this material or similar material has not been and will not be submitted to or published in any other publication.

#### ACKNOWLEDGMENTS

Authors want to thank Mr David de Pablo for his work preparing the samples and Patricia Tejedor, MD for helping on the edition of the manuscript.

#### DECLARATION OF CONFLICTING INTERESTS

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

#### FUNDING

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: Funds were provided by Takeda Pharmaceutical; however, we do not have any contractual relation with the company and had complete liberty on the study design and elaboration. We do not have any other relationships or activities that could appear to have influenced the submitted work.

#### ORCID iD

Carlos García-Vásquez  <http://orcid.org/0000-0003-4177-7919>

#### REFERENCES

1. Buchs NC, Gervaz P, Secic M, Bucher P, Mugnier-Konrad B, Morel P. Incidence, consequences and risk factors for anastomotic dehiscence after colorectal surgery: a prospective monocentric study. *Int J Colorectal Dis* 2008;**23**:265–70
2. Szade A, Grochot-Przeczek A, Florczyk U, Jozkowicz A, Dulak J. Cellular and molecular mechanisms of inflammation-induced angiogenesis. *IUBMB Life* 2015;**67**:145–59
3. D'Ignazio L, Rocha S. Hypoxia induced NF- $\kappa$ B. *Cells* 2016;**5**:10–18
4. Muz B, de la Puente P, Azab F, Azab AK. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia* 2015;**3**:83–92
5. Darby IA, Hewitson TD. Hypoxia in tissue repair and fibrosis. *Cell Tissue Res* 2016;**365**:553–62
6. Kumar H, Choi D-K. Hypoxia inducible factor pathway and physiological adaptation: a cell survival pathway? *Mediators Inflamm* 2015;**2015**:584758.
7. D'Ignazio L, Bandarra D, Rocha S. NF- $\kappa$ B and HIF crosstalk in immune responses. *Febs J* 2016;**283**:413–24
8. Rogler G, Brand K, Vogl D, Page S, Hofmeister R, Andus T, Knuechel R, Baeuerle PA, Schölmerich J, Gross V. Nuclear factor  $\kappa$ B is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology* 1998;**115**:357–69
9. EPAR EMEA. TC-014-IN, TC-016-IN y TC-013-IN, <http://www.emea.eu.int/humandocs/Humans/EPAR/tachosil/tachosil.htm>. (accessed August 2015).
10. Tallón-Aguilar L, Lopez-Bernal FA, Muntane-Relat J, García-Martínez JA, Castillo-Sánchez E, Padillo-Ruiz J. The use of TachoSil as sealant in an experimental model of colonic perforation. *Surg Innov* 2015;**22**:54–60
11. García-Vásquez C, Gómez García de Las Heras S, Pastor Idoate C, De Pablo D, Fernández-Aceñero MJ. Histopathological changes associated to an absorbable fibrin patch (Tachosil®) covering in an experimental model of high-risk colonic anastomoses. *Histol Histopathol* 2018;**33**:299–306
12. Walker KG, Bell SW, Rickard MJ, Mehanna D, Dent OF, Chapuis PH, Bokey EL. Anastomotic leakage is predictive of diminished survival after potentially curative resection for colorectal cancer. *Ann Surg* 2004;**240**:255–59
13. Choudhry H, Harris AL. Advances in hypoxia-inducible factor biology. *Cell Metab* 2018;**27**:281–98
14. Suárez-Grau JM, Bernardos García C, Cepeda Franco C, Mendez García C, García Ruiz S, Docobo Durantez F, Morales-Conde S, Padillo Ruiz J. Fibrinogen-thrombin collagen patch reinforcement of high-risk colonic anastomoses in rats. *World J Gastrointest Surg* 2016;**8**:627–33
15. Pantelis D, Beissel A, Kahl P, Wehner S, Vilz TO, Kalff JC. The effect of sealing with a fixed combination of collagen matrix-bound coagulation factors on the healing of colonic anastomoses in experimental high-risk mice models. *Langenbecks Arch Surg* 2010;**395**:1039



## **RESUMEN DE LOS RESULTADOS GLOBALES**

## 6. RESULTADOS GLOBALES

- En una primera fase del proyecto se realiza un experimento piloto con 10 animales en los que se diseña el modelo de anastomosis crítica mediante ligadura selectiva de la arteria marginal cecal y posterior construcción de la anastomosis utilizando el segmento afecto. Tras al sacrificio de los animales al 5º día postoperatorio se observó un porcentaje del 30% de dehiscencia macroscópica sin identificarse diferencias en el grado de severidad de adherencias postquirúrgicas entre animales con dehiscencia anastomótica vs. animales sin fuga.

En una segunda fase del proyecto se realiza el estudio macroscópico y anatomopatológico de los especímenes de anastomosis reforzadas con Tachosil® versus no reforzadas por parte de un evaluador ciego con los siguientes hallazgos:

- Respecto a la fuga anastomótica y su relación con el parche de Tachosil®, obtuvimos una tasa global de fuga anastomótica del 34,5%. Se observó una reducción significativa del porcentaje de dehiscencia de anastomosis en el grupo casos frente al grupo control (13,3% vs. 57,1%;  $p=0,013$ ).

- El porcentaje global de abscesos perianastomóticos fue del 53,5%. Se observó un aumento significativo del porcentaje de abscesos perianastomóticos en el grupo casos frente al grupo control (78,5% vs. 28,5%;  $p<0,01$ ).

- Desde el punto de vista microscópico se observó una predominancia por el infiltrado de polimorfonucleares sin encontrar diferencias significativas entre grupos. Tampoco se observó diferencia significativa en el grado de neovascularización entre los grupos, con presencia de esta en todas las muestras al igual que los signos de necrosis. La reacción inflamatoria visible

por el patólogo no presentó diferencias significativas entre los grupos. De la misma manera no se logró demostrar diferencias significativas entre los grupos en el resto de variables microscópicas analizadas en la segunda fase: adherencias, necrosis, depósito de colágeno y tipo de reacción inflamatoria celular.

En la tercera fase del proyecto, se realizó el análisis IHQ de los marcadores moleculares elegidos para valorar el proceso de cicatrización vinculado con la hipoxia:

- En primer lugar, en el grupo control, encontramos una expresión únicamente nuclear del HIF-1 $\alpha$  en las células epiteliales del lecho quirúrgico, en comparación con la expresión nuclear y citoplasmática observada en el estudio de tejido normal alejado de la zona isquémica.
- Se comparó el patrón de expresión en el grupo casos, observando que en las muestras analizadas la expresión del HIF-1 $\alpha$  se torna mayoritariamente citoplasmática en todas las áreas de la muestra, reduciendo de forma relativa y estadísticamente significativa la expresión nuclear. Encontramos una relación significativa entre la expresión citoplasmática del HIF-1 $\alpha$  y una reacción inflamatoria más intensa.
- Respecto a la expresión IHQ de NF-kB-p65 se encontró una mayor expresión a nivel del endotelio del lecho quirúrgico (72,7% vs 33%;  $p < 0,05$ ). También se observó un aumento llamativo de su expresión en los fibroblastos tanto del lecho quirúrgico como en tejidos cercanos sin llegar a alcanzar significación estadística. En referencia al resto del patrón de expresión de NF-kB-p65 en relación con la presencia del parche no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

## DISCUSIÓN

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1 Modelo experimental de anastomosis crítica

El presente estudio demuestra que la realización de un modelo de anastomosis ileo-cólica crítica por isquemia es factible y fácilmente reproducible, observándose una elevada tasa de dehiscencia de anastomosis clínica. Experiencias previas de otros grupos parecían indicar que en animales sanos, la existencia de isquemia como único factor de riesgo podría no ser suficiente para ocasionar un aumento de los fallos anastomóticos en ratones.<sup>113</sup> Es por esto que la practica totalidad de los estudios publicados previamente eligen el modelo murino y se basan en el método de crear un defecto sobre la confección de la anastomosis con resultado favorables al parche sobre reducción de la dehiscencia anastomótica.<sup>114-117</sup> Tras un análisis de la literatura médica sobre aplicación de SF y dehiscencia de anastomosis solamente encontramos el trabajo de Nordentoft y cols. trabajo con un diseño parecido al nuestro, que se basa en un modelo experimental con cerdos y la aplicación de Tachosil® primero sin intervención para valorar el efecto de la aplicación del parche y luego al igual que en la mayoría de los estudios, induciendo un defecto anatómico sobre la anastomosis, sin interferir sobre la vascularización del intestino unido.<sup>118, 119</sup>

En nuestro caso, observamos un aumento significativo de la tasa de fuga anastomótica, siendo inicialmente de un 30% pero llegando al final del experimento hasta un 57% en los animales del grupo control. Nuestro modelo permite desde nuestra opinión reflejar de manera más real lo que ocurre en la práctica clínica habitual con pacientes que presentan situaciones en las que es impredecible pero inevitable la hipoxia tisular, como puede ser la inestabilidad hemodinámica o factores vasculares que disminuyen la oxigenación del lecho anastomótico, pero en los que bajo ningún concepto introduciremos de forma deliberada defectos durante la confección de la anastomosis. En este sentido es interesante la experiencia publicada por Jo-Anne Attard y cols. sobre las anastomosis intestinales realizadas en sujetos sometidos a hipoxia prolongada,

para ello han sometido a ratones a un ambiente de FiO<sub>2</sub> reducida (en torno al 11%) en cámaras selladas. Este estudio se observó una relación estadísticamente significativa de la hipoxia tisular con el aumento de complicaciones generales sin llegar a la significación en el caso de la dehiscencia anastomótica.<sup>120</sup> Este modelo experimental, debido al requerimiento de una cámara estanca y control estricto de los niveles de O<sub>2</sub> ambiental, presenta grandes dificultades para poder llevarse a cabo en modelos experimentales de mayor tamaño como los cerdos.

## **7.2 Efectos clínicos del Tachosil®**

En el presente estudio se observa que la utilización de un parche de SF para reforzar la anastomosis permite una reducción estadísticamente significativa de la tasa de dehiscencia macroscópica del 23% (57% en el grupo control vs. 13% en el grupo casos).

Desde el punto de vista clínico, nos resulta muy relevante presentar una tasa de reducción del fallo anastomótico desde un 57% en el grupo control hasta un 13% con la aplicación del parche en la zona anastomosada. Consideramos que este hallazgo debe ser validado mediante ensayos clínicos de mayor potencia incluyendo sujetos humanos, y nuestra experiencia resulta una base óptima para ello, justificando razonablemente el empleo de un material que ha probado su seguridad en la práctica clínica habitual. En la literatura existen otros estudios que presentan resultados en línea con nuestros hallazgos, reduciendo de forma significativa la tasa de fuga al utilizar el parche como medio de refuerzo tras la anastomosis, aunque como se ha comentado previamente, utilizando un modelo animal basado en el fallo estructural o mecánico en la confección de la anastomosis. Hasta el momento y con lo previamente publicado, presentamos el segundo modelo sobre cerdos y el primero que evalúa estos efectos sobre anastomosis técnicamente satisfactorias pero sometidas a una isquemia estandarizada.<sup>118,120,121</sup>

Cabe destacar que en los resultados del experimento se observó una mayor tasa de abscesos perianastomóticos en relación con la colocación del parche. Estos hallazgos pueden ser explicados por la presencia de la matriz de colágeno y su propio efecto como cuerpo extraño, proporcionando un punto de anidado a los patógenos presentes en la zona anastomótica posiblemente por contaminación durante la construcción de la anastomosis. Sin embargo, pensamos que dichos abscesos no han influido significativamente en el proceso de cicatrización, justificándose por la reducción observada de la tasa anastomótica. Tampoco se vieron reflejados de una forma clínica clara, ya que los animales del estudio no presentaron diferencias significativas en cuanto a signos de infección, ni se comportaron de manera diferente durante el periodo de estabulación.

A pesar de la presencia de alertas médicas sobre el posible aumento de obstrucciones intestinales en relación con adherencias intraabdominales aparecidas con el uso del parche reportadas por la EMA, no hemos encontrado diferencias entre los grupos, con una alta tasa de presentación en ambos con una posible relación con el proceso inflamatorio generado con la anastomosis y la isquemia, pero sin verse modificada por la presencia del parche, en este sentido existen antecedentes que parecen avalar esta circunstancia.<sup>121, 122</sup>

### **7.3 Otros efectos histopatológicos del Tachosi®**

En relación con el análisis histopatológico del lecho anastomótico con el uso de Tachosil®, hemos comparado nuestros resultados con dos estudios previos, pero que eligieron modelos murinos.<sup>118,120</sup> Estos investigadores diseñaron dos modelos experimentales en ratas para validar sus observaciones clínicas y propusieron que Tachosil® se comporta como un agente de sellado con efecto terapéutico y no solo como un mero refuerzo de las suturas, probablemente actuando en la prevención de la fuga anastomótica no solo como una barrera física. Consideramos relevante que dichos modelos experimentales

también encontraron un mayor porcentaje de microabscesos en el grupo que recibió los parches de Tachosil® de forma similar a nuestra experiencia.

En nuestro estudio hemos observado que la necrosis se encontraba más localizada en el grupo casos frente a una expresión generalizada de necrosis e inflamación en el grupo control no recubiertos, pero estos hallazgos no alcanzan la significación estadística ( $p=0,19$ ). Como se ha comentado previamente, están descritos los cambios histopatológicos en el intestino hipóxico y algunos grupos, incluido el nuestro<sup>128</sup>, no han encontrado diferencias significativas respecto a la inflamación en relación a la presencia del parche, lo que se encuentra en línea con los efectos clínicos esperados<sup>126,127</sup>.

En base a nuestros hallazgos y las experiencias previas se puede concluir que Tachosil® contiene o limita la inflamación y reduce el riesgo de fuga a la cavidad peritoneal a través de un efecto mecánico, de sellado y hemostático en el lecho quirúrgico. En todo caso, consideramos que para poder validar nuestros hallazgos de una forma determinante es necesario ampliar el estudio de los cambios causados por la presencia del parche y poder entender su correlación con el resultado final de disminución de la dehiscencia anastomótica.

## **7.4 Expresión inmunohistoquímica de la hipoxia y la influencia del Tachosil®**

Tras un estudio exhaustivo de la literatura médica publicada hasta el momento, ningún trabajo anterior ha analizado las vías moleculares que controlan la hipoxia en el modelo de isquemia intestinal en cerdos. Hemos elegido la expresión inmunohistoquímica de p65 (parte del complejo NF- $\kappa$ B) y HIF-1 $\alpha$  para determinar si el parche ocasiona cambios significativos en las vías moleculares que subyacen en la respuesta del tejido a la hipoxia. Como ya se ha expuesto previamente, primero hemos analizado la expresión normal de estas moléculas en los casos control, sin ningún parche de fibrina. Como se esperaba, hemos observado una expresión de HIF-1 $\alpha$  aumentada en los tejidos sometidos a hipoxia, donde el HIF-1 $\alpha$  se transloca a los núcleos en las criptas basales. Los



trabajos experimentales previos, principalmente en modelos de desarrollo de tumores, han demostrado que HIF-1 $\alpha$  se acumula en el citoplasma en condiciones hipóxicas y luego se transloca al núcleo, donde se une a HIF-1 $\beta$  y promueve la transcripción de los genes que median o estimulan la proliferación celular.<sup>129</sup> Nuestros resultados están en línea con esos hallazgos, ya que también hemos encontrado expresión nuclear en las células de la cripta epitelial del lecho quirúrgico, con el objetivo de iniciar la reparación tisular del área dañada. Además, hemos visto una alta expresión de NF- $\kappa$ B en los fibroblastos del lecho quirúrgico, también de acuerdo con una respuesta de curación local, pero sin diferencias en el resto del patrón de expresión de esta molécula.

Con los cambios en los marcadores moleculares de isquemia descritos, creemos que se ha validado en el modelo experimental la existencia de isquemia en el lecho quirúrgico. Hemos encontrado que en la zona isquémica el HIF-1 $\alpha$  se expresa de forma casi exclusiva a nivel del núcleo en las células epiteliales de la anastomosis, contrario al tejido no isquémico donde la expresión es tanto a nivel nuclear como citoplasmático. Teniendo en cuenta que la descripción del HIF-1 $\alpha$  se ha relacionado con el desarrollo y crecimiento de ciertos tumores, su estudio ha permitido aclarar su relación con muchas vías de activación de la respuesta tisular al daño causado por la hipoxia y por ello a día de hoy se ha descrito que el HIF activa una serie de genes, conocidos como genes de respuesta a la hipoxia, que están involucrados en la proliferación celular, producción de colágeno y la reestructuración del tejido lesionado con el objetivo de restituir la configuración normal de los tejidos.<sup>129</sup> En todo caso, el HIF-1 $\alpha$  no es el único factor involucrado en la repuesta tisular al daño producido por la isquemia, en este sentido el NF- $\kappa$ B aumenta la expresión del gen HIF-1 $\alpha$  como se demuestra en líneas celulares y muchos modelos experimentales, pero también parece que HIF-1 $\alpha$  puede aumentar la expresión de NF- $\kappa$ B-p65 en una relación recíproca. NF- $\kappa$ B es realmente una gran familia de moléculas, de las cuales RelA (p65), p50 y c-Rel son las mejor comprendidas. Además, parece claro que la interacción entre estas vías complejas puede cambiar dependiendo del tipo de célula o tejido, para obtener el efecto biológico requerido en cada caso.<sup>125,126</sup>

Al comparar los cambios en el grupo control y el grupo cubierto por Tachosil®, hemos encontrado una disminución significativa en la expresión

nuclear de HIF-1 $\alpha$  y una mayor expresión de NF- $\kappa$ B-p65 en células endoteliales del lecho quirúrgico. La reducción en la expresión nuclear del HIF-1 $\alpha$  parece indicar un retraso en la activación de las señales que regulan la proliferación celular y podría ser un signo de cierto retraso en la respuesta proliferativa de curación en el lecho quirúrgico. En la segunda publicación mostramos que el parche ocasionó una mayor formación de abscesos en el sitio quirúrgico y esta reacción inflamatoria está asociada a una mayor vascularización (aunque esto último sin significación estadística). Esta mayor vascularización podría reflejarse molecularmente en la expresión más elevada de NF- $\kappa$ B-p65, pensamos que la expresión de NF- $\kappa$ B-p65 en fibroblastos traduce una reacción tisular de neoangiogénesis cuyo objetivo es facilitar la curación

En resumen, hemos observado que la presencia del parche está asociada a una reacción inflamatoria más localizada o limitada a la zona de anastomosis, lo cual retrasa o al menos altera la respuesta del tejido a la hipoxia, como lo demuestra la falta de translocación de HIF-1 $\alpha$  en los núcleos celulares en la base de las criptas, pero por otro lado, el parche mejora la neovascularización mediada por NF- $\kappa$ B-p65 en un intento de favorecer la cicatrización del tejido después de una reacción inflamatoria. A pesar de que inicialmente lo puede parecer, estos hallazgos moleculares no se presentan como incompatibles con un efecto clínico beneficioso, condicionado por una reducción significativa de la fuga anastomótica. Explicar el por qué de este hallazgo es complejo y sobrepasa el objetivo y alcance del presente estudio pero pensamos que puede estar en relación con el efecto de soporte y sellado del parche de fibrina, que parece ser uno de los factores que contribuye a limitar la reacción inflamatoria al área del parche, posiblemente reduciendo el riesgo de inflamación generalizada del lecho quirúrgico con los efectos negativos subsiguientes sobre la estabilidad de la sutura. En todo caso, como se ha comentado con anterioridad, se requiere de estudios adicionales para comprender la relación entre el retraso del proceso inflamatorio y la disminución de la dehiscencia anastomótica.

## **LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS**

## 8. LIMITACIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

### 8.1 Limitaciones

El presente estudio valora los efectos de la aplicación del Tachosil® sobre el intestino de un modelo animal, que a pesar de su similitud, podría no representar la situación real ocurrida en humanos. Sin embargo, a diferencia de los estudios previamente publicados, hemos elegido un modelo experimental con el objeto de igualar al máximo la anatomía y fisiología del intestino humano.

La interacción entre parche y tejido isquémico es sumamente compleja y el estudio de los cambios clínicos, microscópicos e inmunohistoquímicos realizado en este proyecto no son suficientes para comprender la totalidad del efecto. Adicionalmente la tendencia actual es a una mayor seguridad en las condiciones de las anastomosis ya que en los últimos años el desarrollo de técnicas quirúrgicas que permiten valorar el estado de vascularización de los extremos anastomóticos, como por ejemplo el verde de Indocianina y los sistemas ópticos para su detección intraoperatoria, ciertamente disminuirán la confección de anastomosis hipoperfundidas. Sin embargo, existen todavía multitud de situaciones en las que una anastomosis adecuadamente realizada desde un punto de vista técnico pueda verse sometida a isquemia por lo que creemos que el modelo presentado es perfectamente válido para reproducir las posibles situaciones que se den en pacientes complejos en la práctica clínica.

Otra posible limitación del estudio puede ocurrir en al considerar el periodo entre la primera intervención quirúrgica y el sacrificio de los animales al 5º día postoperatorio. Consideramos que este periodo puede inducir sesgos en el análisis de adherencias postoperatorias ya que estas tardarían más tiempo en formarse, y por esto no tener hallazgos comparables al resto de la literatura que parece inclinarse hacia una mayor formación de adherencias con el uso del parche.

## **8.2 Perspectivas futuras**

Con el presente proyecto se abren varias líneas de investigación en relación con el empleo de SF en el estudio de las dehiscencias del sutura. Se pueden plantear futuros estudios “embebiendo” el parche en antibióticos o antisépticos antes de su aplicación con la hipótesis de encontrar un mecanismo para evitar o al menos disminuir la formación de microabscesos. De igual forma, se pudieran plantear modificaciones técnicas en la cara externa del parche para evitar las adherencias con el resto de las vísceras. Por último, y posiblemente como línea de investigación más interesante, hay varios estudios publicados en la actualidad sobre la hipótesis de que es posible aplicar células madre mesenquimales en el parche con el objetivo de modular la respuesta inflamatoria y del proceso de cicatrización de las anastomosis intestinales.

## CONCLUSIONES

## 9. CONCLUSIONES

- La presencia de un parche de fibrina recubriendo anastomosis ileo-cólicas de alto riesgo condicionadas por isquemia reduce de forma significativa la tasa de dehiscencia anastomótica .
- El modelo experimental utilizado en el estudio de anastomosis en cerdos, mediante isquemia secundaria a una devascularización del segmento colónico anastomosado, es válido y reproducible produciendo un alto porcentaje de fallo anastomótico.
- La presencia de un parche de Tachosil® sobre una anastomosis de alto riesgo condicionada por isquemia no aumenta de forma significativa la formación de adherencias postoperatorias al compararse con el grupo control.
- La presencia de un parche de Tachosil® sobre una anastomosis de alto riesgo condicionada por isquemia aumenta de forma significativa el porcentaje de formación de abscesos en lecho quirúrgico al compararse con el grupo control.
- La presencia del parche Tachosil® provoca una respuesta inflamatoria intensa que modifica la expresión de las moléculas del complejo NF- $\kappa$ B y HIF-1 $\alpha$  en el lecho quirúrgico. Este hallazgo puede resultar paradójico, puesto que el parche parece inducir a un retraso en el comienzo del proceso de cicatrización de la anastomosis mediada por HIF-1 $\alpha$  mientras que induce a una elevada expresión de NF- $\kappa$ B-p65 en fibroblastos cuyo objetivo es facilitar la curación.

## **BIBLIOGRAFIA**



## BIBLIOGRAFIA

1. Travers B. An inquiry into the process of nature in repairing injuries of the intestines: illustrating the treatment of penetrating wounds and strangulated hernia. London: Longman, Hurst, Rees, Orme, and Brown; 1812. x, 384, [8] p. p.
2. Lembert A. Nouveau procede d'enterorrhaphie. J Repertoire General d'Anatome et de Physiologie Pathologique. 1826;2:3.
3. Connell MJMR. An experimental contribution looking to an improved technique in enterorrhaphy, whereby the number of knots is reduced to two, or even one. 1892;42(12):335.
4. Halsted WS. CIRCULAR SUTURE OF THE INTESTINE--AN EXPERIMENTAL STUDY. 5. J The American Journal of the Medical Sciences. 1887(188):436.
5. Bertelsen CA, Andreassen AH, Jorgensen T, Harling H, Danish Colorectal Cancer G. Anastomotic leakage after anterior resection for rectal cancer: risk factors. Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland. 2010;12(1):37-43.
6. Vara Thorbeck R CcE, Jiménez FJ. Cierres de laparotomía. . In: Ethicon, editor. Los cierres problemáticos de la cavidad abdominal2000. p. 103-32.
7. Irvin TT, Goligher JC. Aetiology of disruption of intestinal anastomoses. The British journal of surgery. 1973;60(6):461-4.
8. Sarin S, Lightwood RG. Continuous single-layer gastrointestinal anastomosis: a prospective audit. The British journal of surgery. 1989;76(5):493-5.
9. Burch JM, Franciose RJ, Moore EE, Biffl WL, Offner PJ. Single-layer continuous versus two-layer interrupted intestinal anastomosis: a prospective randomized trial. Ann Surg. 2000;231(6):832-7.
10. Buchs NC, Gervaz P, Secic M, Bucher P, Mugnier-Konrad B, Morel P. Incidence, consequences, and risk factors for anastomotic dehiscence after

colorectal surgery: a prospective monocentric study. *International journal of colorectal disease*. 2008;23(3):265-70.

11. Goligher JC, Graham NG, De Dombal FT. Anastomotic dehiscence after anterior resection of rectum and sigmoid. *The British journal of surgery*. 1970;57(2):109-18.

12. Graham MF, Drucker DE, Diegelmann RF, Elson CO. Collagen synthesis by human intestinal smooth muscle cells in culture. *Gastroenterology*. 1987;92(2):400-5.

13. Elson CO, Kagnoff MF, Fiocchi C, Befus AD, Targan S. Intestinal immunity and inflammation: recent progress. *Gastroenterology*. 1986;91(3):746-68.

14. Thornton FJ, Barbul A. Healing in the gastrointestinal tract. *The Surgical clinics of North America*. 1997;77(3):549-73.

15. Clark MA, Plank LD, Hill GL. Wound healing associated with severe surgical illness. *World journal of surgery*. 2000;24(6):648-54.

16. Mattox CTRDBMEK. Capítulo 6 Cicatrización de las heridas. *Sabiston Tratado de cirugía*. 20th Edition ed: Elsevier; 2018. p. 128.

17. Grum CM. Tissue oxygenation in low flow states and during hypoxemia. *Crit Care Med*. 1993;21(2 Suppl):S44-9.

18. Kiel JW, Riedel GL, Shepherd AP. Autoregulation of canine gastric mucosal blood flow. *Gastroenterology*. 1987;93(1):12-20.

19. JL M-C. Eficacia del nitroprusiato de sodio sobre la cicatrización de las anastomosis intestinales. *Tesis Doctoral.: Universida de Colima*; 2001.

20. Doherty G. *Current Diagnosis and Treatment Surgery* 14 ed: McGraw-Hill Education - Europe; 2015. 1392 p.

21. Krarup PM, Jorgensen LN, Andreasen AH, Harling H, Danish Colorectal Cancer G. A nationwide study on anastomotic leakage after colonic cancer surgery. *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland*. 2012;14(10):e661-7.

22. Nerstrom M, Krarup PM, Jorgensen LN, Agren MS. Therapeutic improvement of colonic anastomotic healing under complicated conditions: A systematic review. *World Journal of Gastrointestinal Surgery*. 2016;8(5):389-401.
23. Trencheva K, Morrissey KP, Wells M, Mancuso CA, Lee SW, Sonoda T, et al. Identifying important predictors for anastomotic leak after colon and rectal resection: prospective study on 616 patients. *Ann Surg*. 2013;257(1):108-13.
24. Alves A, Panis Y, Trancart D, Regimbeau JM, Pocard M, Valleur P. Factors associated with clinically significant anastomotic leakage after large bowel resection: multivariate analysis of 707 patients. *World journal of surgery*. 2002;26(4):499-502.
25. Parodi F IM. Anastomosis y suturas gastrointestinales. In: J S, editor. Libro texto de Cirugía: SECLAP; 2002.
26. Nikolian VC, Kamdar NS, Regenbogen SE, Morris AM, Byrn JC, Suwanabol PA, et al. Anastomotic leak after colorectal resection: A population-based study of risk factors and hospital variation. *Surgery*. 2017;161(6):1619-27.
27. Jung SH, Yu CS, Choi PW, Kim DD, Park IJ, Kim HC, et al. Risk factors and oncologic impact of anastomotic leakage after rectal cancer surgery. *Dis Colon Rectum*. 2008;51(6):902-8.
28. Nesbakken A, Nygaard K, Lunde OC, Blucher J, Gjertsen O, Dullerud R. Anastomotic leak following mesorectal excision for rectal cancer: true incidence and diagnostic challenges. *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland*. 2005;7(6):576-81.
29. Leightle SW, Mouawad NJ, Welch KB, Lampman RM, Cleary RK. Risk factors for anastomotic leakage after colectomy. *Dis Colon Rectum*. 2012;55(5):569-75.
30. Lipska MA, Bissett IP, Parry BR, Merrie AE. Anastomotic leakage after lower gastrointestinal anastomosis: men are at a higher risk. *ANZ journal of surgery*. 2006;76(7):579-85.
31. Biondo S, Pares D, Kreisler E, Rague JM, Fraccalvieri D, Ruiz AG, et al. Anastomotic dehiscence after resection and primary anastomosis in left-sided colonic emergencies. *Dis Colon Rectum*. 2005;48(12):2272-80.

32. Masoomi H, Buchberg B, Dang P, Carmichael JC, Mills S, Stamos MJ. Outcomes of right vs. left colectomy for colon cancer. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*. 2011;15(11):2023-8.
33. Localio SA, Chassin JL, Hinton JW. Tissue protein depletion; a factor in wound disruption. *Surgery, gynecology & obstetrics*. 1948;86(1):107-13.
34. Iancu C, Mocan LC, Todea-Iancu D, Mocan T, Acalovschi I, Ionescu D, et al. Host-related predictive factors for anastomotic leakage following large bowel resections for colorectal cancer. *Journal of gastrointestinal and liver diseases : JGLD*. 2008;17(3):299-303.
35. Parthasarathy M, Greensmith M, Bowers D, Groot-Wassink T. Risk factors for anastomotic leakage after colorectal resection: a retrospective analysis of 17 518 patients. *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland*. 2017;19(3):288-98.
36. van Vugt JL, Reisinger KW, Derikx JP, Boerma D, Stoot JH. Improving the outcomes in oncological colorectal surgery. *World journal of gastroenterology*. 2014;20(35):12445-57.
37. Rullier E, Laurent C, Garrelon JL, Michel P, Saric J, Parneix M. Risk factors for anastomotic leakage after resection of rectal cancer. *The British journal of surgery*. 1998;85(3):355-8.
38. Komen N, Dijk JW, Lalmahomed Z, Klop K, Hop W, Kleinrensink GJ, et al. After-hours colorectal surgery: a risk factor for anastomotic leakage. *International journal of colorectal disease*. 2009;24(7):789-95.
39. Vignali A, Fazio VW, Lavery IC, Milsom JW, Church JM, Hull TL, et al. Factors associated with the occurrence of leaks in stapled rectal anastomoses: a review of 1,014 patients. *Journal of the American College of Surgeons*. 1997;185(2):105-13.
40. Choi HK, Law WL, Ho JW. Leakage after resection and intraperitoneal anastomosis for colorectal malignancy: analysis of risk factors. *Dis Colon Rectum*. 2006;49(11):1719-25.

41. Boersema GSA, Wu Z, Kroese LF, Vennix S, Bastiaansen-Jenniskens YM, van Neck JW, et al. Hyperbaric oxygen therapy improves colorectal anastomotic healing. *International journal of colorectal disease*. 2016;31(5):1031-8.
42. Rocha AA, Coy CSR, Góes JRN, Ayrizono MdLS, Wu FC, Fagundes JJ. Estudo comparativo da hiperoxigenação hiperbárica em alças cólicas isquêmicas em ratos J *Acta Cirurgica Brasileira*. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2005;20:152-8.
43. Nickelsen TN, Jorgensen T, Kronborg O. Lifestyle and 30-day complications to surgery for colorectal cancer. *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)*. 2005;44(3):218-23.
44. Eriksen MT, Wibe A, Norstein J, Haffner J, Wiig JN, Norwegian Rectal Cancer G. Anastomotic leakage following routine mesorectal excision for rectal cancer in a national cohort of patients. *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland*. 2005;7(1):51-7.
45. Konishi T, Watanabe T, Kishimoto J, Nagawa H. Risk factors for anastomotic leakage after surgery for colorectal cancer: results of prospective surveillance. *Journal of the American College of Surgeons*. 2006;202(3):439-44.
46. Makela JT, Kiviniemi H, Laitinen S. Risk factors for anastomotic leakage after left-sided colorectal resection with rectal anastomosis. *Dis Colon Rectum*. 2003;46(5):653-60.
47. Zhang W, Lou Z, Liu Q, Meng R, Gong H, Hao L, et al. Multicenter analysis of risk factors for anastomotic leakage after middle and low rectal cancer resection without diverting stoma: a retrospective study of 319 consecutive patients. *International journal of colorectal disease*. 2017;32(10):1431-7.
48. Nasir Khan MU, Abir F, Longo W, Kozol R. Anastomotic disruption after large bowel resection. *World journal of gastroenterology*. 2006;12(16):2497-504.
49. Saif MW, Elfiky A, Salem RR. Gastrointestinal perforation due to bevacizumab in colorectal cancer. *Annals of surgical oncology*. 2007;14(6):1860-9.
50. Jiborn H, Ahonen J, Zederfeldt B. Healing of experimental colonic anastomoses. I. Bursting strength of the colon after left colon resection and anastomosis. *American journal of surgery*. 1978;136(5):587-94.

51. Seal JB, Morowitz M, Zaborina O, An G, Alverdy JC. The molecular Koch's postulates and surgical infection: a view forward. *Surgery*. 2010;147(6):757-65.
52. Cohn I, Jr., Rives JD. Antibiotic protection of colon anastomoses. *Ann Surg*. 1955;141(5):707-17.
53. Alverdy JC. Microbiome Medicine: This Changes Everything. *Journal of the American College of Surgeons*. 2018;226(5):719-29.
54. Wiegerinck M, Hyoju SK, Mao J, Zaborin A, Adriaansens C, Salzman E, et al. Novel de novo synthesized phosphate carrier compound ABA-PEG20k-Pi20 suppresses collagenase production in *Enterococcus faecalis* and prevents colonic anastomotic leak in an experimental model. *The British journal of surgery*. 2018;105(10):1368-76.
55. Gaines S, Shao C, Hyman N, Alverdy JC. Gut microbiome influences on anastomotic leak and recurrence rates following colorectal cancer surgery. *The British journal of surgery*. 2018;105(2):e131-e41.
56. Brasken P. Healing of experimental colon anastomosis. *The European journal of surgery Supplement : = Acta chirurgica Supplement*. 1991(566):1-51.
57. Matthiessen P, Hallbook O, Andersson M, Rutegard J, Sjodahl R. Risk factors for anastomotic leakage after anterior resection of the rectum. *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland*. 2004;6(6):462-9.
58. Martinez-Ramos D, Escrig-Sos J, Miralles-Tena JM, Rivadulla-Serrano MI, Daroca-Jose JM, Salvador Sanchis JL. [Influence of surgeon specialization upon the results of colon cancer surgery. Usefulness of propensity scores]. *Revista espanola de enfermedades digestivas : organo oficial de la Sociedad Espanola de Patologia Digestiva*. 2008;100(7):387-92.
59. Bilimoria KY, Phillips JD, Rock CE, Hayman A, Prystowsky JB, Bentrem DJ. Effect of surgeon training, specialization, and experience on outcomes for cancer surgery: a systematic review of the literature. *Annals of surgical oncology*. 2009;16(7):1799-808.

60. Biondo S, Kreisler E, Millan M, Fracalvieri D, Golda T, Frago R, et al. Impact of surgical specialization on emergency colorectal surgery outcomes. *Archives of surgery (Chicago, Ill : 1960)*. 2010;145(1):79-86.
61. European Society of Coloproctology Collaborating G. The impact of stapling technique and surgeon specialism on anastomotic failure after right-sided colorectal resection: an international multicentre, prospective audit. *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland*. 2018.
62. Patankar SK, Larach SW, Ferrara A, Williamson PR, Gallagher JT, DeJesus S, et al. Prospective comparison of laparoscopic vs. open resections for colorectal adenocarcinoma over a ten-year period. *Dis Colon Rectum*. 2003;46(5):601-11.
63. Docherty JG, McGregor JR, Akyol AM, Murray GD, Galloway DJ. Comparison of manually constructed and stapled anastomoses in colorectal surgery. West of Scotland and Highland Anastomosis Study Group. *Ann Surg*. 1995;221(2):176-84.
64. Merad F, Yahchouchi E, Hay JM, Fingerhut A, Laborde Y, Langlois-Zantain O. Prophylactic abdominal drainage after elective colonic resection and suprapromontory anastomosis: a multicenter study controlled by randomization. French Associations for Surgical Research. *Archives of surgery (Chicago, Ill : 1960)*. 1998;133(3):309-14.
65. Garcia-Olmo D, Lucas FJ, Paya J. Effects of an intra-abdominal latex (drain-like) tube on anastomotic resistance and adhesion formation in a rat model. *Dis Colon Rectum*. 1996;39(3):311-7.
66. Peel AL, Taylor EW. Proposed definitions for the audit of postoperative infection: a discussion paper. Surgical Infection Study Group. *Annals of The Royal College of Surgeons of England*. 1991;73(6):385-8.
67. Bruce J, Krukowski ZH, Al-Khairi G, Russell EM, Park KG. Systematic review of the definition and measurement of anastomotic leak after gastrointestinal surgery. *The British journal of surgery*. 2001;88(9):1157-68.

68. Hyman N, Manchester TL, Osler T, Burns B, Cataldo PA. Anastomotic leaks after intestinal anastomosis: it's later than you think. *Ann Surg.* 2007;245(2):254-8.
69. Rahbari NN, Weitz J, Hohenberger W, Heald RJ, Moran B, Ulrich A, et al. Definition and grading of anastomotic leakage following anterior resection of the rectum: a proposal by the International Study Group of Rectal Cancer. *Surgery.* 2010;147(3):339-51.
70. Dindo D, Demartines N, Clavien PA. Classification of surgical complications: a new proposal with evaluation in a cohort of 6336 patients and results of a survey. *Ann Surg.* 2004;240(2):205-13.
71. Frye J, Bokey EL, Chapuis PH, Sinclair G, Dent OF. Anastomotic leakage after resection of colorectal cancer generates prodigious use of hospital resources. *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland.* 2009;11(9):917-20.
72. Khan AA, Wheeler JM, Cunningham C, George B, Kettlewell M, Mortensen NJ. The management and outcome of anastomotic leaks in colorectal surgery. *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland.* 2008;10(6):587-92.
73. Krarup PM, Nordholm-Carstensen A, Jorgensen LN, Harling H. Anastomotic leak increases distant recurrence and long-term mortality after curative resection for colonic cancer: a nationwide cohort study. *Ann Surg.* 2014;259(5):930-8.
74. Mirnezami A, Mirnezami R, Chandrakumaran K, Sasapu K, Sagar P, Finan P. Increased local recurrence and reduced survival from colorectal cancer following anastomotic leak: systematic review and meta-analysis. *Ann Surg.* 2011;253(5):890-9.
75. Platell C, Barwood N, Dorfmann G, Makin G. The incidence of anastomotic leaks in patients undergoing colorectal surgery. *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland.* 2007;9(1):71-9.



76. Gastinger I, Marusch F, Steinert R, Wolff S, Koeckerling F, Lippert H, et al. Protective defunctioning stoma in low anterior resection for rectal carcinoma. *The British journal of surgery*. 2005;92(9):1137-42.
77. Nisar PJ, Lavery IC, Kiran RP. Influence of neoadjuvant radiotherapy on anastomotic leak after restorative resection for rectal cancer. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*. 2012;16(9):1750-7.
78. Telem DA, Chin EH, Nguyen SQ, Divino CM. Risk factors for anastomotic leak following colorectal surgery: a case-control study. *Archives of surgery (Chicago, Ill : 1960)*. 2010;145(4):371-6; discussion 6.
79. Mori L, Vita M, Razzetta F, Meinero P, D'Ambrosio G. Ghost ileostomy in anterior resection for rectal carcinoma: is it worthwhile? *Dis Colon Rectum*. 2013;56(1):29-34.
80. Nakagami H, Morishita R, Maeda K, Kikuchi Y, Ogihara T, Kaneda Y. Adipose Tissue-Derived Stromal Cells as a Novel Option for Regenerative Cell Therapy. *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis*. 2006;13(2):77-81.
81. Reckhenrich AK, Kirsch BM, Wahl EA, Schenck TL, Rezaeian F, Harder Y, et al. Surgical Sutures Filled with Adipose-Derived Stem Cells Promote Wound Healing. *PLoS ONE*. 2014;9(3):e91169.
82. Pascual I, de Miguel GF, Gomez-Pinedo UA, de Miguel F, Arranz MG, Garcia-Olmo D. Adipose-derived mesenchymal stem cells in biosutures do not improve healing of experimental colonic anastomoses. *The British journal of surgery*. 2008;95(9):1180-4.
83. Sukho P, Boersema GSA, Cohen A, Kops N, Lange JF, Kirpensteijn J, et al. Effects of adipose stem cell sheets on colon anastomotic leakage in an experimental model: Proof of principle. *Biomaterials*. 2017;140:69-78.
84. Georgiev-Hristov T, Garcia-Arranz M, Garcia-Gomez I, Garcia-Cabezas MA, Trebol J, Vega-Clemente L, et al. Sutures enriched with adipose-derived stem cells decrease the local acute inflammation after tracheal anastomosis in a murine model. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*. 2012;42(3):e40-7.

85. Liu L, Chiu PWY, Lam PK, Poon CCY, Lam CCH, Ng EKW, et al. Effect of local injection of mesenchymal stem cells on healing of sutured gastric perforation in an experimental model. *BJS*. 2015;102(2):e158-e68.
86. Caziuc A, Calin Dindelegan G, Pall E, Mironiuc A. Stem cells improve the quality of colonic anastomoses - A systematic review. *Journal of BUON : official journal of the Balkan Union of Oncology*. 2015;20(6):1624-9.
87. Singer AJ, Thode HC, Jr. A review of the literature on octylcyanoacrylate tissue adhesive. *American journal of surgery*. 2004;187(2):238-48.
88. Reece TB, Maxey TS, Kron IL. A prospectus on tissue adhesives. *American journal of surgery*. 2001;182(2 Suppl):40S-4S.
89. Vakalopoulos KA, Bosmans J, van Barneveld Kwy, Vogels RRM, Boersema GSA, Wu Z, et al. Impact of tissue adhesives on the prevention of anastomotic leakage of colonic anastomoses: an in vivo study. *International journal of colorectal disease*. 2017;32(7):961-5.
90. Rogers AC, Turley LP, Cross KS, McMonagle MP. Meta-analysis of the use of surgical sealants for suture-hole bleeding in arterial anastomoses. *The British journal of surgery*. 2016;103(13):1758-67.
91. Torres-Melero J, Motos-Mico JJ, Lorenzo-Linan M, Morales-Gonzalez A, Rosado-Cobian R. [Use of absorbable fibrin sealant patch to strengthen the gastrointestinal anastomosis performed on patients with peritoneal carcinomatosis treated with intention to cure by debulking surgery and intraoperative hyperthermic intraperitoneal chemotherapy]. *Cirugia y cirujanos*. 2016;84(2):102-8.
92. Nordentoft T, Pommergaard HC, Rosenberg J, Achiam MP. Fibrin glue does not improve healing of gastrointestinal anastomoses: a systematic review. *European surgical research Europäische chirurgische Forschung Recherches chirurgicales europeennes*. 2015;54(1-2):1-13.
93. Heiss WH. The use of synthetic polymeric materials as suture substitutes and their place in pediatric surgery. *Progress in pediatric surgery*. 1970;1:99-150.
94. Frilling A, Stavrou GA, Mischinger HJ, de Hemptinne B, Rokkjaer M, Klempnauer J, et al. Effectiveness of a new carrier-bound fibrin sealant versus

argon beamer as haemostatic agent during liver resection: a randomised prospective trial. *Langenbeck's archives of surgery*. 2005;390(2):114-20.

95. Lang G, Csekeo A, Stamatis G, Lampl L, Hagman L, Marta GM, et al. Efficacy and safety of topical application of human fibrinogen/thrombin-coated collagen patch (TachoComb) for treatment of air leakage after standard lobectomy. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*. 2004;25(2):160-6.

96. Di Carlo I, Pulvirenti E, Toro A. Use of a fibrinogen- and thrombin-coated patch for peptic ulcer perforation repair. *Hepato-gastroenterology*. 2009;56(91-92):575-7.

97. Rickenbacher A, Breitenstein S, Lesurtel M, Frilling A. Efficacy of TachoSil a fibrin-based haemostat in different fields of surgery--a systematic review. *Expert opinion on biological therapy*. 2009;9(7):897-907.

98. Informe EPAR EMEA. Estudios TC-014-IN, TC-016-IN y TC-013-IN. European Medicines Agency; 2009.

99. Wagner Grau P. El factor HIF-1 inducido por la hipoxia y la sensibilidad al oxígeno: Rol del hierro intracelular. *Acta Médica Peruana*. 2011;28:163-8.

100. Caramelo C, J. Peña Deudero J, Castilla M, Justo S, De Solis A, Neria F, et al. Respuesta a la hipoxia: Un mecanismo sistémico basado en el control de la expresión génica. *Medicina (Buenos Aires)*. 2006;66:155-64.

101. Karhausen J, Furuta GT, Tomaszewski JE, Johnson RS, Colgan SP, Haase VH. Epithelial hypoxia-inducible factor-1 is protective in murine experimental colitis. *The Journal of clinical investigation*. 2004;114(8):1098-106.

102. Fradette C, Du Souich P. Effect of hypoxia on cytochrome P450 activity and expression. *Current drug metabolism*. 2004;5(3):257-71.

103. Karin M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature*. 2006;441(7092):431-6.

104. Lopez-Bojorquez LN. La regulacion del factor de transcripcion NF- $\kappa$ B. Un mediador molecular en el proceso inflamatorio. *Revista de investigacion clinica*. 2004;56:83-92.

105. Schmidt KN, Amstad P, Cerutti P, Baeuerle PA. The roles of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of transcription factor NF-kappa B. *Chemistry & biology*. 1995;2(1):13-22.
106. Goebeler M, Roth J, Brocker EB, Sorg C, Schulze-Osthoff K. Activation of nuclear factor-kappa B and gene expression in human endothelial cells by the common haptens nickel and cobalt. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1995;155(5):2459-67.
107. Swindle MM, Makin A, Herron AJ, Clubb FJ, Jr., Frazier KS. Swine as models in biomedical research and toxicology testing. *Veterinary pathology*. 2012;49(2):344-56.
108. Lee K, Redel BK, Spate L, Teson J, Brown AN, Park KW, et al. Piglets produced from cloned blastocysts cultured in vitro with GM-CSF. *Molecular reproduction and development*. 2013;80(2):145-54.
109. Frasson M, Flor-Lorente B, Rodriguez JL, Granero-Castro P, Hervas D, Alvarez Rico MA, et al. Risk Factors for Anastomotic Leak After Colon Resection for Cancer: Multivariate Analysis and Nomogram From a Multicentric, Prospective, National Study With 3193 Patients. *Ann Surg*. 2015;262(2):321-30.
110. Otchy D, Hyman NH, Simmang C, Anthony T, Buie WD, Cataldo P, et al. Practice parameters for colon cancer. *Dis Colon Rectum*. 2004;47(8):1269-84.
111. Walker KG, Bell SW, Rickard MJ, Mehanna D, Dent OF, Chapuis PH, et al. Anastomotic leakage is predictive of diminished survival after potentially curative resection for colorectal cancer. *Ann Surg*. 2004;240(2):255-9.
112. Del Canizo Lopez JF, Lopez Martin D, Lledo Garcia E, Garcia Barreno P. [Design of experimental models in surgical investigation]. *Actas Urol Esp*. 2008;32(1):27-40.
113. Pommergaard HC, Achiam MP, Burcharth J, Rosenberg J. Impaired blood supply in the colonic anastomosis in mice compromises healing. *Int Surg*. 2015;100(1):70-6.
114. Pommergaard HC, Rosenberg J, Schumacher-Petersen C, Achiam MP. Choosing the best animal species to mimic clinical colon anastomotic leakage in humans: a qualitative systematic review. *European surgical research*

Europäische chirurgische Forschung Recherches chirurgicales européennes. 2011;47(3):173-81.

115. Tallon-Aguilar L, Lopez-Bernal Fde A, Muntane-Relat J, Garcia-Martinez JA, Castillo-Sanchez E, Padillo-Ruiz J. The use of TachoSil as sealant in an experimental model of colonic perforation. Surg Innov. 2015;22(1):54-60.

116. Pantelis D, Beissel A, Kahl P, Wehner S, Vilz TO, Kalff JC. The effect of sealing with a fixed combination of collagen matrix-bound coagulation factors on the healing of colonic anastomoses in experimental high-risk mice models. Langenbeck's archives of surgery. 2010;395(8):1039-48.

117. Suarez-Grau JM, Bernardos Garcia C, Cepeda Franco C, Mendez Garcia C, Garcia Ruiz S, Docobo Durantez F, et al. Fibrinogen-thrombin collagen patch reinforcement of high-risk colonic anastomoses in rats. World Journal of Gastrointestinal Surgery. 2016;8(9):627-33.

118. Nordentoft T, Romer J, Sorensen M. Sealing of gastrointestinal anastomoses with a fibrin glue-coated collagen patch: a safety study. Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research. 2007;20(6):363-9.

119. Nordentoft T, Holte K. Preventing Clinical Leakage of Colonic Anastomoses with A Fibrin-Coated Collagen Patch Sealing - An Experimental Study. Archives of Clinical and Experimental Surgery (ACES). 2014;3(4):201-6.

120. Attard JA, Raval MJ, Martin GR, Kolb J, Afrouzian M, Buie WD, et al. The effects of systemic hypoxia on colon anastomotic healing: an animal model. Dis Colon Rectum. 2005;48(7):1460-70.

121. Nohuz E, Darcha C, Moreno W, Tamburro S, Yanez M, Mulliez A, et al. Efficiency of TachoSil® to prevent postsurgical adhesion development on laparoscopic rat model. Gynecological Surgery. 2009;6(4):323-9.

122. Pérez T, Enciso S, Díaz-Güemes I, Sánchez FM. Adhesion Prevention with TachoSil®: Conventional and Laparoscopic Approaches for Hysterotomy and Simulated Adhesiolysis in Swine. Journal of Minimally Invasive Gynecology. 2011;18(6):S118.

## **ANEXOS**

## Anexo 4: Presentación resumen de la comunicación oral

### XXXI Congreso Nacional de Cirugía 2016 - Madrid

#### Nuevo modelo porcino para estudio de anastomosis de alto riesgo secundario a hipoperfusión



García Vázquez C, Pastor Idoate C, Fernández Aceñero MJ, García Gómez de las Heras MS, Tejedor Togores P, De Pablo D, García Olmo D.

Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz  
Hospital Universitario Infanta Elena  
Hospital Universitario Clínico San Carlos

**Justificación y Objetivos:** Por razones éticas evidentes el estudio de anastomosis sobre animales constituye una forma de poder evaluar las consecuencias y factores de riesgo en casos de fallo anastomótico intestinal, pero la baja tasa de dehiscencia en condiciones normales de animales sanos ha motivado multitud de estudios experimentales para la creación de modelos que disminuyan en lo posible el número de especímenes con los que obtener validez estadística. El objetivo de este estudio es presentar un modelo de anastomosis intestinal en cerdos, en los cuales a pesar de realizar una técnica quirúrgica estándar, y debido a la modificación de la vascularización normal, presenta una alta tasa de fallo, simulando las condiciones reales de la práctica clínica al realizar anastomosis de alto riesgo como puede ser la anastomosis colorrectal o en personas de edad avanzada.

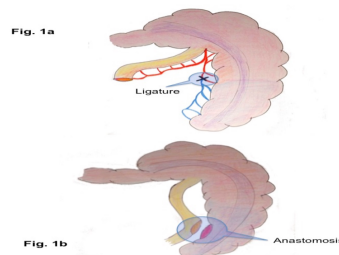
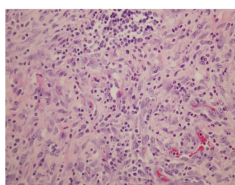
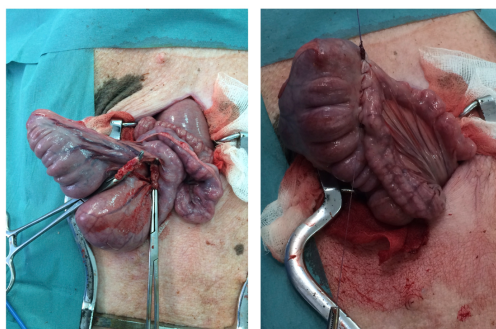


Fig. 1a: confección de zona isquémica mediante ligadura.  
Fig. 1b: confección de anastomosis latero-lateral.

**Material y Método:** Previa medidas de antisepsia y anestesia según protocolo habitual del quirófano experimental se realizaron anastomosis ileo-colicas, latero-laterales, con boca anastomótica de 2cm y según técnica quirúrgica estándar en 10 cerdos "Large White" posterior a una devascularización estandarizada de los 15 cm distales del ciego, que corresponde al extremo colónico de la anastomosis. Al 5º día postoperatorio los animales fueron sacrificados y se recuperaron las piezas de anastomosis realizando estudio macroscópico y microscópico de la línea de anastomosis.



Corte histológico ilustrativo de la neovascularización

**Resultado:** Los 10 procedimientos se llevaron a cabo sin complicaciones inmediatas, el tiempo medio de la intervención fue de 23 minutos, durante la estabulación todos los animales tuvieron un comportamiento dentro de la normalidad. Desde el punto de vista macroscópico, en 3 casos (30%) se evidenció fuga anastomótica, caracterizado por absceso y contaminación fecal en la zona de la anastomosis sin signos de peritonitis difusos o a distancia. Los resultados del estudio anatomopatológico muestra una celularidad predominante de polimorfonucleares (media 83,5%), en 6 casos se aprecia la presencia de neovasos, sin relación significativa a la presencia de fuga y una distribución de la necrosis a partes iguales entre focal y diseminada.

**Conclusiones:** El modelo porcino representa una buena alternativa en el estudio de las anastomosis intestinales extrapolable al humano, con las modificaciones aquí propuestas constituye un modelo válido para estudiar el fallo debido a la isquemia severa, con un efecto beneficioso desde el punto de vista estadístico como lo es el aumento de la tasa de fallo presentado lo que hace asumible desde el punto de vista ético el número de individuos necesarios para obtener resultados significativos.

#### Bibliografía:

- Pommergaard HC, Rosenberg J, Schumacher-Petersen C, Achiam MP. Choosing the best animal species to mimic clinical colon anastomotic leakage in humans: a qualitative systematic review. Eur Surg Res 2011;47:173-81.
- Pommergaard HC, Achiam MP, Burcharth J, Rosenberg J. Impaired blood supply in the colonic anastomosis in mice compromises healing without creating clinical leakage. Int Surg. In press.
- Nordentoft T, Holte K. Preventing Clinical Leakage of Colonic Anastomoses with A Fibrin - Coated Collagen Patch Sealing - An Experimental Study. Arch Clin Exp Surg 2014;3:201-206

Av. de los Reyes Católicos, 21, 28342 Valdemoro, Madrid 91 894 84 10 [www.hospitalinfantaelena.es](http://www.hospitalinfantaelena.es)  
Av. de los Reyes Católicos, 2, 28040 Madrid 91 550 48 00 [www.fjd.es](http://www.fjd.es)  
Calle del Prof. Martín Lagos, s/n, 28040 Madrid 91 330 30 01 [www.madrid.org/hospitalclinicossancarlos](http://www.madrid.org/hospitalclinicossancarlos)

## Anexo 5: Poster

**XXI**  
Reunión Nacional de la Fundación  
Asociación Española de  
**COLOPROCTOLOGÍA**  
Sección de Coloproctología de la AEC

Almería, 17, 18 y 19 de Mayo de 2017

**Eficacia del Tachosil® para prevenir fuga anastomótica en :  
intestinales de riesgo: Estudio experimental y aleatorizado en cerdos.**

García Vázquez C, Pastor Idoate C, Fernández Aceñero MJ, García Gómez de las Heras MS, Valverde I, Tejedor Togores P, De Pablo D.

Hospital Universitario Fundación Jiménez Díaz  
Hospital Universitario Infanta Elena  
Hospital Universitario Clínico San Carlos  
Hospital General de Collado Villalba

**Objetivos:**

Los sellantes de fibrina son usados para reducir las complicaciones asociadas a hemorragia intraoperatoria. Por las características de estos materiales, parece lógico que puedan ser útiles en el refuerzo de suturas intestinales. El objetivo del estudio es valorar el efecto del refuerzo de anastomosis ileocólicas isquémicas con parches Tachosil®.

**Material y Métodos:**

Se emplearon para el modelo experimental cerdos de raza Large-White. Tras abordaje de cavidad peritoneal, se identifica el colon ascendente, ciego e ileon terminal procediéndose a ligar la arcada vascular marginal de los últimos 15cm. del ciego. Posteriormente, se realiza una anastomosis ileo-cólica manual, latero-lateral. Se randomiza la colocación del parche de refuerzo en un grupo de casos vs. no refuerzo en grupo control. Los animales fueron sacrificados al 5º día postoperatorio realizándose reexploración de la cavidad abdominal y resección de la anastomosis para estudio anatomopatológico.

Fig. 1a: confección de zona isquémica mediante ligadura.

Fig. 1b: confección de anastomosis latero-lateral.

Corte histológico ilustrativo de la neovascularización

**Resultados:**  
Se incluyeron en el estudio 28 cerdos. Se observó una reducción significativa en la tasa de dehiscencia anastomótica en el grupo con refuerzo (6.9% vs. 27.6% en no refuerzo;  $p=0,01$ ). La presencia del parche se asoció a una tasa más elevada de microabscesos (41% refuerzo vs. 14% no refuerzo). No se observaron entre ambos grupos diferencias significativas en cuanto a reacción inflamatoria local, neovascularización o porcentaje de necrosis. La utilización del parche tampoco produjo un aumento significativo de adherencias intestinales.

**Conclusiones:**  
En nuestra experiencia con la utilización de parches de Tachosil® para cubrir suturas intestinales de riesgo se consigue una disminución en la tasa de dehiscencias sin aumentar el grado de adherencias. Sin embargo, se han observado en el estudio histológico aumentos significativos de microabscesos por reacción a cuerpo extraño.

**Bibliografía:**  
- Pommergaard HC, Rosenberg J, Schumacher-Petersen C, Achiam MP. Choosing the best animal species to mimic clinical colon anastomotic leakage in humans: a qualitative systematic review. Eur Surg Res 2011;47:173-81.  
- Pommergaard HC, Achiam MP, Burchardt J, Rosenberg J. Impaired blood supply in the colonic anastomosis in mice compromises healing without creating clinical leakage. Int Surg. In press.  
- Nordentoft T, Holte K. Preventing Clinical Leakage of Colonic Anastomoses with A-Fibrin-Coated Collagen Patch Sealing - An Experimental Study. Arch Clin Exp Surg 2014;3:201-206

Av. de los Reyes Católicos, 21, 28342 Valdemoro, Madrid 91 894 84 10 [www.hospitalinfantaelena.es](http://www.hospitalinfantaelena.es)  
Av. de los Reyes Católicos, 2, 28040 Madrid 91 550 48 00 [www.fjd.es](http://www.fjd.es)  
Calle del Prof. Martín Lagos, s/n, 28040 Madrid 91 330 30 01 [www.madrid.org/hospitalclinicossancarlos](http://www.madrid.org/hospitalclinicossancarlos)